



Ana Margarida Rodrigues Rebelo

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

Produção de Espumas 3D Porosas por Auto-Organização de Nanofibras de Policaprolactona

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador: João Paulo Borges, Professor Auxiliar, DCM-FCT/UNL
Co-orientador: Jorge Carvalho e Silva, Professor Auxiliar, DF-FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Mário António Basto Forjaz Secca
Arguente: Prof. Doutora Ana Isabel Nobre Martins Aguiar Oliveira Ricardo
Vogais: Prof. Doutor Jorge Alexandre Monteiro Carvalho e Silva
Prof. Doutor João Paulo Miranda Ribeiro Borges



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2013

Produção de Espumas 3D Porosas por Auto-Organização de Nanofibras de Policaprolactona

Copyright © 2013 - Todos os direitos reservados. Ana Margarida Rodrigues Rebelo;
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

*“A essência do conhecimento consiste
em aplicá-lo, uma vez possuído.”*

Confúcio

Agradecimentos

Uma Dissertação de Mestrado não é um trabalho investigativo de meros 6 meses, mas um resumo do conhecimento adquirido a todos níveis, transmitido por professores, colegas, amigos e família. Assim, quero deixar um primeiro grande agradecimento aos meus orientadores, Professor João Paulo Borges e Professor Jorge Carvalho e Silva, por todo o conhecimento transmitido e por todo o apoio e disponibilidade demonstradas. Com eles, pude alargar os meus horizontes, crescer e aprender a ser crítica.

À Ana Baptista e à Joana Vasconcelos, que me auxiliaram na concretização deste trabalho, mostrando sempre disponibilidade e simpatia.

A todos os colegas do laboratório que tornaram os dias de trabalho mais agradáveis e divertidos.

Aos meus colegas e amigos que me acompanharam durante esta longa jornada, e que contribuíram para dar um brilho diferente à minha vida. À Ana Ruxa, Carina Santos, Sara Praça, Ricardo Ribeiro, Guilherme Coutinho e especialmente à Vanessa Cunha e à Inês Machado por toda a alegria e por terem estado sempre presentes.

Aos pilares da minha vida – mãe, irmã e o meu Miguel –, pelo apoio incondicional e por todo o ânimo dado quando mais preciso. Mãe, o meu suporte; Irmã, a minha amiga; Miguel, o meu coração.

A todos vocês um muitíssimo obrigada!

E claro, ao Pai de todas as coisas – Deus –, que com toda a certeza sem Ele nada disto seria possível.

Resumo

A auto-organização de nanofibras em forma de favos pelo processo de electrofiação, tem mostrado enorme interesse a diferentes níveis, principalmente por superar algumas limitações encontradas nas usuais membranas não tecidas. Esta organização das fibras confere características únicas aos *scaffolds*, particularmente promissoras em Engenharia de Tecidos, nomeadamente em regeneração óssea ou da dentina. O empilhamento destas estruturas, proporcionado por um colector com depressões, conduz à formação estratificada de espumas 3D, que se assemelha à estrutura do osso trabecular.

Neste trabalho, as estruturas foram produzidas a partir de soluções poliméricas de policaprolactona (PCL). O efeito que os parâmetros de electrofiação têm na formação dos favos foi avaliado, assim como a adição de hidroxiapatite (HAp) à solução polimérica. Utilizaram-se concentrações entre 1 e 7 % m/m de polímero e à de 7 % m/m, incorporou-se 5 e 10 % m/V de HAp.

As soluções foram analisadas quanto à sua condutividade e viscosidade e as membranas, quanto à sua composição química e bioactividade.

Foram realizados ensaios de compressão às espumas, tendo-se revelado o comportamento típico de um sólido celular 3D, com módulo de Young entre 6 e 9 kPa. As espumas apresentaram porosidade sensivelmente de 94 % e viabilidade celular superior a 80 %.

Palavras chave: Auto-Organização, Electrofiação, Espumas, Policaprolactona, Hidroxiapatite, Engenharia de Tecidos

Abstract

Self-assembling nanofibers into honeycomb structures by electrospinning process has generated a huge interest at different levels, especially for the process to overcome some limitations commonly found in non-woven mats. The organizational structure of these fibers are comprised of unique characteristics to the scaffolds and is especially promising in Tissue Engineering, namely in bone or dentin regeneration. The bulking of these structures, allowed by a hole collector, lead to a stratified formation of 3D foams that is similar to the structure of trabecular bone.

In this work, the structures were produced by polymeric solutions of polycaprolactone (PCL). The effect from electrospinning parameters have on honeycomb-like formation was evaluated, as well as hydroxyapatite addition into polymeric solution. The solutions used were between 1 and 7 % w/w of polymer and HAp was added at 5 and 10 % w/V to the 7 % w/w solution.

The solutions' conductivity and viscosity were analysed, and also mats' chemical composition and bioactivity.

The foam's compression demonstrate a 3D cellular solid typical behaviour, with Young modulus between 6 and 9 kPa, indicating a porosity level of circa 94 % and cellular viability over 80 %.

Key words: Self-Assembling, Electrospinning, Foams, Polycaprolactone, Hydroxyapatite, Tissue Engineering

Índice de Matérias

Agradecimentos.....	v
Resumo.....	vii
Abstract	ix
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas.....	xvii
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	xx
Lista de Símbolos	xxii
Enquadramento do tema e Motivação	1
1. Introdução.....	3
1.1. Tecidos duros	3
1.1.1. Tecido ósseo	4
1.1.2. Tecidos do órgão dentário: Dentina e Osso alveolar.....	5
1.2. Engenharia de Tecidos na regeneração óssea e na dentina	6
1.2.1. Materiais para a produção de <i>scaffolds</i>	7
1.2.1.1. Compósitos.....	7
1.2.2. Métodos de produção de <i>scaffolds</i>	9
2. Materiais e Métodos	11
2.1. Materiais.....	11
2.1.1. Reagentes	11
2.1.2. Preparação das soluções	12
2.2. Métodos de produção	12
2.2.1. Processo de Electrofiação.....	12
2.2.1.1. Montagem.....	21
2.3. Métodos de caracterização	22
2.3.1. Medição da condutividade das soluções	22
2.3.2. Medição da viscosidade das soluções	22
2.3.3. Porosidade das espumas	25
2.3.4. Composição química	25
2.3.5. Análise morfológica das membranas e das espumas	26
2.3.6. Avaliação da bioactividade	27

2.3.7. Ensaio de compressão	28
2.3.8. Testes de adesão e de citotoxicidade das espumas.....	30
3. Resultados e Discussão	33
3.1. Condutividade das soluções	33
3.2. Viscosidade das soluções	34
3.3. Composição química	35
3.4. Membranas	38
3.4.1. Análise morfológica	38
3.4.1.1. Variação da concentração.....	38
3.4.1.2. Variação da tensão.....	41
3.4.1.3. Variação da distância da agulha ao colector	43
3.4.1.4. Variação do caudal	44
3.4.1.5. Variação do tempo de deposição	46
3.4.1.6. Variação da humidade.....	47
3.4.1.7. Variação de mais do que um parâmetro simultaneamente	49
3.4.1.8. Adição de HAp.....	50
3.4.1.9. Conclusões.....	53
3.4.2. Avaliação da bioactividade	54
3.5. Espumas	55
3.5.1. Análise morfológica	55
3.5.2. Porosidade	57
3.5.3. Ensaio de compressão	57
3.5.4. Testes de adesão e de citotoxicidade.....	59
4. Conclusões e Perspectivas futuras.....	63
Bibliografia.....	65
Anexos.....	73
Anexo A	74
Anexo B.....	76
Anexo C.....	77

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Esquema ilustrativo das principais estruturas do tecido ósseo [19].....	4
Figura 1.2 – Estrutura anatómica do dente e ampliação de um corte transversal da dentina [24, 25].....	6
Figura 1.3 – Estrutura linear da poli(ϵ -caprolactona) [30].....	8
Figura 2.1 – Esquema de montagem do processo de electrofiação [50]	13
Figura 2.2 – Ilustração esquemática da formação do cone de Taylor: (A) As cargas superficiais são induzidas na solução polimérica devido ao campo eléctrico. (B) Alongamento da gota no capilar. (C) Deformação da gota para formar o cone de Taylor devido à repulsão das cargas. Um fino jacto inicia-se a partir do cone (adaptado de [51]).....	14
Figura 2.3 – Solução polimérica com (A) elevada viscosidade, em que as moléculas de solvente estão distribuídas pelas moléculas poliméricas entrelaçadas e (B) baixa viscosidade, em que as moléculas de solvente, que tendem a aglomerar-se devido à acção da tensão superficial [29] ...	15
Figura 2.4 – Imagem esquemática do efeito do aumento da viscosidade da solução polimérica na morfologia das fibras resultantes por electrofiação (adaptado de [52])	16
Figura 2.5 – Diferentes geometrias de colectores: (A) placa estática; (B) eléctrodos paralelos; (C) disco rotativo; (D) cilindro rotativo; (E) grelha [52]	19
Figura 2.6 – Imagem do colector de depressões utilizado, em que as depressões têm dimensões $\varnothing = 10 \text{ mm}$ e $e = 2 \text{ mm}$, com uma área total de $11 \times 11 \text{ mm}^2$	21
Figura 2.7 – Curvas características de fluidos Newtonianos e não-Newtonianos independentes do tempo (à esquerda), e não-Newtonianos dependentes do tempo (à direita) [61]	24
Figura 2.8 – Viscosímetro rotacional cone-prato [62]	24
Figura 2.9 – Esquema da origem das cargas negativas à superfície da HAp e do processo de formação de apatites no osso, numa solução de SBF (adaptado de [66])	27
Figura 2.10 – Esquema da alteração da morfologia do material e dos poros durante um ensaio de compressão [68]	28

Figura 2.11 – Curva típica de compressão de uma espuma (adaptado [69]).....	29
Figura 2.12 – Esquema de uma célula (aberta) unitária de um sólido celular [69].....	30
Figura 2.13 – Montagem da placa de 24 poços para cultura celular: a azul, os vários materiais e a verde, os controlos.....	31
Figura 3.1 – Condutividade das soluções das várias concentrações	34
Figura 3.2 – Curvas de fluxo das soluções.....	35
Figura 3.3 – Espectro de absorção FTIR de uma membrana constituída por PCL e de pós de HAp	36
Figura 3.4 – Espectro de absorção FTIR de uma membrana compósita constituída por PCL e HAp, em que os picos assinalados com H correspondem aos da HAp	37
Figura 3.5 – Imagens de SEM de membranas obtidas a (A.1) e (A.2) P7, (B.1) e (B.2) P5, (C.1) e (C.2) P3, e (D.1) e (D.2) P1, com ampliações de x500 e x5000	39
Figura 3.6 – Fenómeno de polarização num material dieléctrico [78].....	40
Figura 3.7 – Esquema do balanço entre as forças electrostáticas atrativas (seta verde) e repulsivas (seta cor-de-laranja). Representação da cargas negativas que localizam à superfície (adaptado de [42])	41
Figura 3.8 – Imagens de SEM de membranas obtidas à escala indicada de soluções P1 a (A.1) e (A.2) 15 kV, e (B.1) e (B.2) 20 kV, com ampliação de x500 e x5000, respectivamente.....	42
Figura 3.9 – Imagens de SEM de membranas obtidas à escala indicada de soluções P1, com o colector a (A.1) e (A.2) 10 cm , e (B.1) e (B.2) 15 cm, com ampliação de x500 e x5000, respectivamente	Error! Bookmark not defined.
Figura 3.10 – Imagens de SEM de membranas obtidas à escala indicada de soluções P1 com o caudal de (A.1) e (A.2) 0,15 mL/h, (B.1) e (B.2) 0,25 mL/h, e (C.1) e (C.2) 0,75 mL/h, com ampliações de x500 e x5000, respectivamente	45
Figura 3.11 – Imagens de SEM de membranas obtidas à escala indicada, de soluções P1, com tempo de deposição de (A) 1 hora, (B) 2 horas e (C) 4 horas, com ampliação de x500	47

Figura 3.12 – Imagens de SEM de membranas obtidas à escala indicada de 50 μm e ampliação de x5000, de soluções P1, com 2 horas de deposição, para HR entre (A) 30 e 40 %, (B) 40 e 50 % e (C) 50 e 60 %	48
Figura 3.13 – Imagens de SEM de membranas obtidas a (A) P1, 10 kV, 10 cm, 0,25 mL/h e HR entre 40-50 % (ampliação x5000), (B) P1, 20 kV, 20 cm, 0,25 mL/h e HR entre 40-50 % (ampliação x5000), (C) P1, 20 kV, 15 cm, 0,15 mL/h e HR entre 40-50 % (ampliação x1000) e (D) P7, 15 kV, 10 cm, 0,75 mL/h, HR entre 50-60 % e agulha de 0,5 mm de diâmetro interno (ampliação x50).....	49
Figura 3.14 – Imagens de SEM de uma membrana obtida a (A) P7H5 e a (B) P7H10, com ampliação de x50. (C) Imagem de SEM do ângulo de 120° formado na estrutura, com ampliação de x200. (D) Respectivo histograma do diâmetro EC dos favos	51
Figura 3.15 – Imagens de SEM ilustrativas da organização das fibras P7HX (em que X é a fracção de HAp) (A) nas paredes constituintes dos favos e (B) das fibras suspensas nos padrões, com ampliação de x2000. (D) Respectivo histograma do diâmetro das fibras	52
Figura 3.16 – Imagens de SEM ilustrativas da bioactividade das membranas compósitas a (A) P7H5 e a (B) P7H10, com ampliação de x2000. As membranas foram imersas numa solução salina de SBF por 6 dias	55
Figura 3.17 – Esquema de deposição de fibras num colector de depressões, feito com dois materiais (adaptado [39])	56
Figura 3.18 – Imagens de espumas produzidas no colector de depressões (A) vistas a partir do fundo do colector e (B) vistas de cima. (C.1) e (C.2) Imagens de SEM de um corte axial de uma espuma, com ampliações de x100 e x1000, respectivamente. As setas em (B) e em (C.1) apontam para formações em favos	56
Figura 3.19 – Curvas de compressão típicas de espumas constituídas por P7, P7H5 e P7H10, Indicação das zonas elástica, patamar de colapso e densificação. Apresenta-se também a ampliação da região linear, A, com as respectivas regressões lineares.....	58
Figura 3.20 – População celular no primeiro dia de contacto das células com cada um dos materiais	60
Figura 3.21 – Evolução temporal da população celular nos 1º e 2 dias, após contacto das células com cada um dos materiais	61

Figura 3.22 – Imagens de SEM de células aderidas à superfície de espumas a (A) P7 e (B) P7H10, com ampliação x2000	61
--	----

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 – Constituintes principais das fases mineral e orgânica dos tecidos mineralizados do órgão dentário [7, 23]	6
Tabela 1.2 – Vantagens e desvantagens de algumas técnicas de produção de <i>scaffolds</i> [4, 13, 20]	10
Tabela 2.1 – Designação de cada concentração utilizada	12
Tabela 2.2 – Parâmetros de electrofiação utilizados na produção das membranas e das espumas	22
Tabela 2.3 – Comportamento típico de fluidos não-Newtonianos [56-60]	23
Tabela 3.1 – Condutividade das várias soluções usadas	33
Tabela 3.2 – Modos de vibração FTIR identificados na literatura para o PCL e HAp [47, 74-77]	37
Tabela 3.3 – Diâmetro médio das fibras e respectivo desvio padrão, de membranas com diferentes concentrações de PCL	40
Tabela 3.4 – Diâmetro médio das fibras e respectivo desvio padrão, de membranas obtidas a partir de soluções P1, sujeitas a diferentes tensões eléctricas	42
Tabela 3.5 – Diâmetro EC médio dos favos e respectivo desvio padrão, de membranas obtidas a partir de soluções P1, sujeitas a diferentes tensões eléctricas	43
Tabela 3.6 – Diâmetro médio das fibras e respectivo desvio padrão, de membranas obtidas a partir de soluções P1, com o colector colocado a diferentes distâncias	44
Tabela 3.7 – Diâmetro médio EC dos favos e respectivo desvio padrão, de membranas obtidas a partir de soluções P1, com o colector colocado a diferentes distâncias	44
Tabela 3.8 – Diâmetro médio das fibras e respectivo desvio padrão, de membranas obtidas a partir de soluções P1 sujeita a diferentes caudais	45
Tabela 3.9 – Diâmetro EC médio dos favos e respectivo desvio padrão, de membranas obtidas a partir de soluções P1 sujeita a diferentes caudais	46

Tabela 3.10 – Diâmetro EC médio dos favos e respectivo desvio padrão, de membranas obtidas a partir de soluções P1 e com diferentes tempos de deposição	47
Tabela 3.11 – Diâmetro EC médio dos favos e respectivo desvio padrão, de membranas obtidas a partir de soluções P1, sujeitas a diferentes percentagens de HR	48
Tabela 3.12 – Influência dos parâmetros de electrofiação no diâmetro das fibras e dos favos ...	53
Tabela 3.13 – Porosidade de quatro amostras para os três tipos de material	57
Tabela 3.14 – Valores do módulo de Young, da deformação máxima de compressão para as respectivas concentrações (P7, P7H5 e P7H10).....	59

Lista de Abreviaturas e Siglas

ATR – *Attenuated total reflectance*

Ca/P – Razão molar Cálcio/Fósforo

DCM – Diclorometano

DMF – Dimetilformamida

ECT – Engenharia de Células e Tecidos

EC – Equivalente Circular

FDA – *Food and Drug Administration*

FTIR – *Fourier Transform Infrared*

GPC – *Gel Permeation Chromatography*

HAp – Hidroxiapatite

HR – Humidade Relativa

m/m – Razão massa/massa

m/V – Razão massa/volume

PBS – *Phosphate Buffered Saline*

PCL – Policaprolactona

PTFE – Politetrafluoretileno (teflon)

P1 – Concentração de 1 % em massa de policaprolactona

P3 – Concentração de 3 % em massa de policaprolactona

P5 – Concentração de 5 % em massa de policaprolactona

P7 – Concentração de 7 % em massa de policaprolactona

P7H5 – Concentração de 7 % em massa de policaprolactona e de 5 % massa/Volume de hidroxiapatite

P7H10 – Concentração de 7 % em massa de policaprolactona e de 10 % massa/Volume de hidroxiapatite

SBF – *Simulated Body Fluid*

SEM – *Scanning Electronic Microscopy*

Saos-2 – *Sarcoma osteogenic*

VIPS – *Vapor-Induced Phase Separation*

V/V – Razão volume/volume

Lista de Símbolos

E	– Campo eléctrico
E_z	– Campo eléctrico segundo o eixo z
E_n	– Energia
E	– Módulo de Young
l_0	– Comprimento inicial
ϵ_r	– Constante dieléctrica
ϵ_{DCM}	– Constante dieléctrica do diclorometano
ϵ_{DMF}	– Constante dieléctrica do dimetilformamida
ϵ	– Deformação
ϵ_m	– Deformação máxima de compressão
ρ	– Densidade
ρ_a	– Densidade aparente
ρ_m	– Densidade do material
\emptyset	– Diâmetro
e	– Espessura
ν	– Frequência
M_n	– Massa molecular
M	– Massa molar
p_{DCM}	– Momento dipolar do diclorometano
p_{DMF}	– Momento dipolar da dimetilformamida
P	– Polarização
ϵ_0	– Permitividade eléctrica no vácuo
γ	– Taxa de corte
σ	– Tensão
τ	– Tensão de corte
Δl	– Variação de comprimento

η – Viscosidade

χ_e – Susceptibilidade magnética no vácuo

Enquadramento do tema e Motivação

A realização deste trabalho enquadra-se no Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa e tem como fim a produção de espumas 3D porosas à base policaprolactona.

A Engenharia de Células e Tecidos (ECT) é uma área que surgiu no final do século XX (1993) e foi definida por Langer e Vacanti [1] como “um campo interdisciplinar que aplica os princípios de engenharia e ciências da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos que restauram, mantêm ou melhoram a função de um tecido ou de todo um órgão”. Esta área consiste na utilização de células, factores de crescimento e um suporte material (*scaffold*), onde as células possam aderir, migrar e proliferar.

Vários *scaffolds* e métodos têm sido desenvolvidos nesse sentido, com vista à reparação total ou parcial de um tecido. Mediante a realização deste trabalho pretende-se oferecer uma alternativa mais eficaz a estes *scaffolds*, através da auto-organização de nanofibras poliméricas em forma de favos. Estas estruturas permitirão colmatar alguns problemas encontrados nas actuais membranas 2D produzidas, nomeadamente o tamanho de poro e porosidade reduzidos, tão importantes em meio celular. Além disso, a sua incorporação em espumas conduz à formação de uma estrutura 3D estratificada.

O método de produção adoptado neste trabalho foi a electrofiação, que se caracteriza por ser versátil e pouco dispendiosa. Por intermédio da aplicação de um campo eléctrico é possível obterem-se fibras à nanoescala.

Neste trabalho foram produzidas membranas e espumas de PCL e HAp, visando a aplicação na regeneração óssea e na dentina, que constituem dois dos grandes focos da ECT. Desgaste, perda óssea, desmineralização, resultante de traumas ou doenças, são dos problemas mais comuns na sociedade mundial. Os *scaffolds* produzidos darão resposta ao que as técnicas e cirurgias convencionais não conseguem.

A policaprolactona (PCL) é um polímero biocompatível e biodegradável, amplamente estudado e utilizado em ECT. É dotado de boas características mecânicas e boa aderência a uma vasta gama de substratos.

A hidroxiapatite sintética (HAp) é um biocerâmico da família dos fosfatos de cálcio que se mostra muito semelhante à fase mineral do osso e da dentina, e é por isso extensamente utilizada em regeneração de tecidos mineralizados. É bioactivo e possui propriedades osteocondutoras.

Pretendeu-se, com este trabalho, a concretização dos seguintes pontos:

- Determinar quais os parâmetros de electrofiação óptimos para obter as estruturas de fibras auto-organizadas;
- Avaliar a influência que a adição da HAp tem na formação destas estruturas;
- Avaliar o carácter bioactivo das membranas com HAp;
- Produzir as espumas 3D porosas por intermédio da auto-organização das fibras e com o auxílio de um colector com uma geometria específica;
- Analisar morfologicamente as espumas;
- Determinar a porosidade das espumas produzidas e caracterizá-las mecanicamente;
- Confirmar se as espumas apresentam viabilidade celular para possíveis aplicações biológicas.

Este trabalho encontra-se dividido em 4 capítulos:

No Capítulo 1, pretende-se enquadrar o tema tendo em vista a sua aplicação final – o tecido ósseo e a dentina. Neste sentido, torna-se necessário fazer uma breve descrição da constituição destes tecidos e que doenças atingem cada um deles. Segue-se, a ECT aplicada ao tecido ósseo e à dentina, onde se apresentam os materiais já utilizados, com enfoque nas características da policaprolactona e da hidroxiapatite, e de alguns métodos de produção, nomeadamente a electrofiação.

Depois de feito o enquadramento do tema e consolidadas algumas bases teóricas apresentam-se, no Capítulo 2, os materiais utilizados, bem como todos os métodos de produção e caracterização usados neste trabalho.

No Capítulo 3 apresentam-se os resultados obtidos, onde é feita uma análise cuidada dos mesmos. Este capítulo encontra-se dividido em duas partes: a primeira refere-se às membranas produzidas, e a segunda, às espumas.

Por fim, com o conhecimento adquirido nos capítulos anteriores, são tiradas algumas ilações e perspectivas futuras no Capítulo 4.

1. Introdução

Milhões de pessoas em todo mundo são regularmente afectadas por problemas que acometem o tecido ósseo e a dentina, tais como osteoporose, doença de Paget, desmineralização, doença periodontal, displasia da dentina, erosão e sensibilidade dentária, entre outras. As terapias usadas dependem do tipo de tecido e da doença que o atinge. Todos estes problemas conduzem, geralmente, à perda de tecido resultando na perda das suas propriedades químicas e mecânicas [2, 3].

Os tratamentos convencionais em defeitos ósseos passam pelo o uso de enxertos. Os auto e aloenxertos têm sido de longe, os mais utilizados para regeneração óssea, pois fornecem uma fonte natural de células osteogénicas e de factores de crescimento, essenciais para a regeneração e cicatrização ósseas. Contudo, apesar de apresentarem uma relativa taxa de sucesso, apresentam algumas desvantagens: foram relatados casos de morbilidade do local dador em autoenxertos e os aloenxertos podem gerar resposta imunitária (e consequente rejeição), além de serem um meio de transmissão de patógenos do dador para o hospedeiro [4, 5].

Doenças num dos tecidos dentários pode comprometer os restantes tecidos do dente, nomeadamente a dentina. Nos tratamentos dos tecidos dentários recorrem-se usualmente a restaurações do dente lesado, através do preenchimento dos defeitos com materiais sintéticos ou enxertos, ou à sua substituição completa, mediante o uso de próteses. Embora os materiais e técnicas estejam bastante evoluídos, estes tipos de tratamento ainda não são completamente satisfatórios e são geralmente menos funcionais, duráveis e estéticos do que o dente nativo. Além disso, focam-se mais na reparação imediata do que na regeneração tecidual [3, 6, 7]. Também terapias genéticas, células estaminais, revascularização dos canais radicais e enxertos têm sido usados, mas apresentam ainda muitas desvantagens [8].

1.1. Tecidos duros

Os tecidos duros integram uma classe de tecidos que possuem na sua constituição minerais que conferem dureza ao tecido. De entre eles, é de destacar o tecido ósseo que é um tecido conjuntivo mineralizado, a dentina – um dos tecidos duros do dente – e o osso alveolar – que faz parte do periodonto. Apesar do osso alveolar ser tecido ósseo, este será abordado na secção 1.1.2. [9, 10].

1.1.1. Tecido ósseo

O tecido ósseo é o principal constituinte do esqueleto de vertebrados, que serve de suporte para as partes moles, protegendo órgãos vitais como o cérebro e a medula óssea, além de actuar como um órgão metabólico com a maior reserva de cálcio e fósforo [11].

O tecido ósseo está organizado segundo uma estrutura hierárquica heterogênea e anisotrópica, podendo-se distinguir três níveis estruturais – o macro, o micro e o nanoestrutural – representados na Figura 1.1 [12].

O nível macroestrutural é constituído por osso compacto (cerca de 80 % do esqueleto total) e o osso esponjoso (cerca de 20 % do esqueleto total), estando este último revestido por osso compacto [4, 13, 14]. O osso compacto ou cortical é maioritariamente sólido, apresentando apenas cerca de 10 % de porosidade, ao contrário do osso esponjoso ou trabecular, que apresenta aproximadamente, uma porosidade entre 50 e 90 %, fazendo com que o módulo de Young e a resistência à compressão sejam cerca de 20 vezes inferior à do osso cortical. O osso trabecular possui um arranjo semelhante ao de uma esponja, com poros em forma de favos de diferentes tamanhos chamados trabéculas [4, 15, 16]. E termos histológicos, os ossos compacto e esponjoso possuem a mesma estrutura, diferindo entre si apenas na disposição e na quantidade dos seus elementos [15, 17, 18].

O nível microestrutural é constituído por lamelas concêntricas de fibras de colagénio que formam canais (canais de Havers) por onde passam vasos sanguíneos e nervos – Sistema de Havers. Os canais de Havers comunicam entre si através de outros canais transversais ou oblíquos chamados canais de Volkmann. O nível nanoestrutural envolve fibrilas de colagénio e a fase mineral [12, 17, 18].

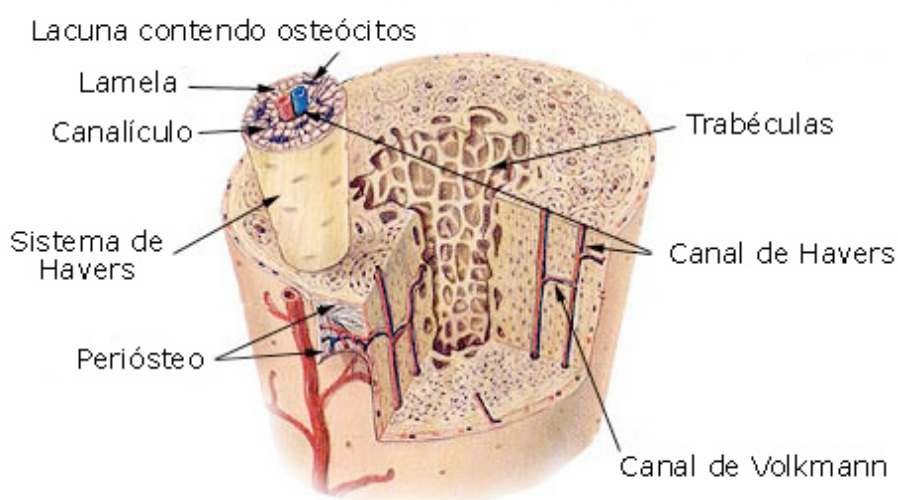


Figura 1.1 – Esquema ilustrativo das principais estruturas do tecido ósseo [19]

Na sua constituição estão células imersas numa matriz extracelular endurecida pela presença de compostos à base de cálcio – matriz óssea [15, 17]. Na matriz óssea pode-se distinguir uma fase inorgânica ou mineral e a fase orgânica. Na fase inorgânica encontramos em maior quantidade, iões fosfato e cálcio, que se organizam na forma de nano-cristais de hidroxiapatite, e em menor quantidade, outros iões como, bicarbonato, magnésio, potássio, etc.. A maturação dos cristais de HAp faz-se ao longo do eixo longitudinal, num crescimento anisotrópico e paralelo às fibrilas de colagénio. Esta fase representa cerca de 50 % do peso de toda a matriz óssea [12].

A fase orgânica do osso é constituída essencialmente por colagénio tipo I (95 %) e uma pequena quantidade de proteoglicanos e glicoproteínas. A associação da HAp com as fibras de colagénio proporciona a dureza e resistência encontradas no tecido ósseo [4, 15, 17, 20].

A produção, manutenção e reabsorção do osso resulta da interacção de três tipos células existentes no mesmo: os osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. Todas elas contribuem para a manutenção saudável do tecido, tendo cada uma, uma função específica [4, 15, 17].

1.1.2. Tecidos do órgão dentário: Dentina e Osso alveolar

Anatomicamente o dente pode ser dividido em coroa, a porção visível e funcional da mastigação e raiz, a porção alojada no interior do osso, cuja função é fixar o dente na cavidade bucal – o periodonto (Figura 1.2). Do ponto de vista estrutural, distinguem-se o esmalte, a dentina e a pulpa, em que o esmalte e a dentina constituem os tecidos mineralizados do dente [7, 21].

A dentina é a camada intermédia entre o esmalte e a pulpa, estando presente na coroa e inserida na raiz através dos seus prolongamentos. A fase orgânica corresponde maioritariamente a fibras de colagénio tipo I, dispostas em pequenos feixes. É formada por milhares de pequenos canalículos, de 2,5 μm de diâmetro junto à pulpa e de 1 μm na superfície externa. Juntamente com a pulpa, um tecido altamente innervado e vascularizado, formam o complexo dentino-pulpar. A dentina mineralizada é sintetizada por odontoblastos localizados na pulpa [7, 21-23].

A estrutura dentária é sustentada pelo periodonto, que envolve a gengiva – periodonto de protecção –, o osso alveolar, o ligamento periodontal e o cemento – periodonto de fixação [7].

O osso alveolar é constituído por tecido ósseo, com fina camada de osso cortical a delimitar o osso trabecular. À semelhança do que foi dito na secção 1.1.1., os cristais de HAp encontram-se alinhados ao longo das fibras de colagénio. A sua estrutura porosa permite a passagem de vasos sanguíneos entre a medula óssea e o ligamento periodontal [7, 21, 23].

Na Tabela 1.1 podemos ver os principais constituintes das fases mineral e orgânica dos tecidos mineralizados do dente.

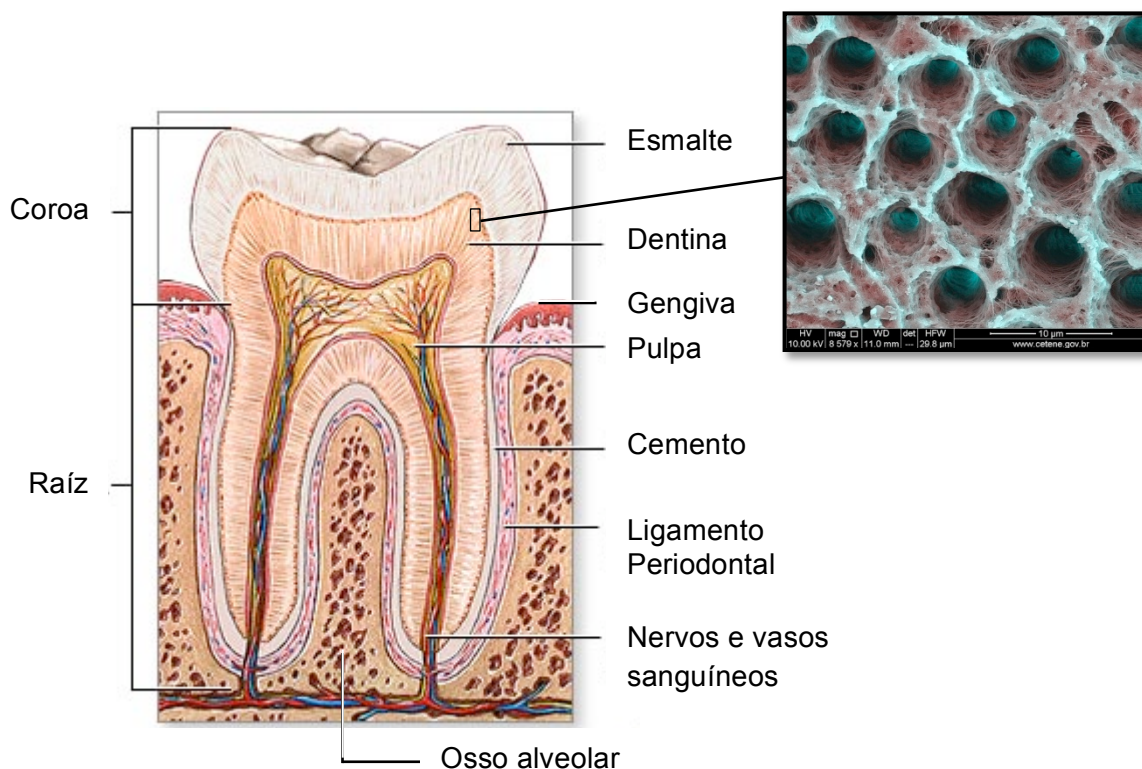


Figura 1.2 – Estrutura anatômica do dente e ampliação de um corte transversal da dentina [24, 25]

Tabela 1.1 – Constituintes principais das fases mineral e orgânica dos tecidos mineralizados do órgão dentário [7, 23]

	Fase mineral	Fase orgânica e água
Esmalte	Fosfatos de cálcio (HAp 96 %)	Enamelina e amelogenina (4 %)
Dentina	Fosfatos de cálcio (HAp 70 %)	Colagénio tipo I e III (20 %) e 10 % água
Osso alveolar	Fosfatos de cálcio (HAp 65 %)	Colagénio I, III e V (35 %)
Cemento	Fosfatos de cálcio (HAp 45 %)	Colagénio tipo I, III e V (35 %) e 20 % água

1.2. Engenharia de Tecidos na regeneração óssea e na dentina

Com vista a fazer face às lesões ósseas e da dentina, vários substitutos têm sido desenvolvidos, principalmente para o osso. De salientar que as características mecânicas do *scaffold* produzido são influenciadas, tanto pelo material, como pelo método de produção escolhido.

1.2.1. Materiais para a produção de *scaffolds*

Os materiais utilizados para a produção de *scaffolds* devem ter em consideração algumas propriedades essenciais, tais como biocompatibilidade e biodegradabilidade [26].

Vários tipos de material têm sido propostos, tais como metais, cerâmicos e polímeros, de origem natural ou sintética. Contudo, os metais e grande parte dos cerâmicos não são biodegradáveis. Além disso, apesar dos metais proporcionarem suporte mecânico imediato no local do defeito, exibem fraca integração com o tecido e pode falhar devido a infecção ou fadiga do material. O uso de polímeros não reabsorvíveis implicam a sua remoção por cirurgia, o que constitui uma desvantagem face aos biodegradáveis. Assim, a escolha fica limitada a um reduzido número de cerâmicos, a polímeros biodegradáveis e a compósitos produzidos a partir destes [4, 15].

1.2.1.1. Compósitos

Os compósitos têm sido muito investigados e utilizados como substitutos de inúmeros tecidos, principalmente por permitirem um fácil controlo das propriedades físicas, químicas e biológicas [13, 20].

Os compósitos são definidos como materiais que resultam da combinação de pelo menos duas fases ou componentes, com propriedades físicas e químicas distintas, permitindo a criação de um material com novas características, que cada um dos componentes individualmente não consegue proporcionar. Em termos de nomenclatura, um material compósito é constituído por uma matriz, que confere estrutura ao compósito, preenchendo espaços vazios, e o reforço, usado para melhorar as propriedades mecânicas, electromagnéticas ou químicas. Existem diversas combinações possíveis de materiais utilizando polímeros, cerâmicos, metais e vários tipos de fibras (ex: fibras de vidro) [27].

Os compósitos mais utilizados em regeneração óssea e dentária são à base de hidroxiapatite (HAp) e polímeros. A HAp sintética é semelhante à parte inorgânica do osso e da dentina, conferindo bioactividade e biointegração com o tecido, e a parte orgânica (ex: colagénio tipo I) é bem mimetizada por um polímero. Assim, a combinação de HAp com um polímero, tem-se mostrado bastante promissora, além de promover a adesão e proliferação celulares no *scaffold* [4].

Os polímeros utilizados podem ser de origem natural (ex: quitosano, ácido hialurónico) ou sintéticos (ex: poli(α -hidroxiácidos), poli(ϵ -caprolactona)). A vantagem do uso de polímeros sintéticos face aos naturais reside essencialmente no melhor controlo das suas propriedades [4, 28].

Policaprolactona

A policaprolactona (PCL, Figura 1.3) é um polímero que evidencia potencialidades para aplicação na regeneração de vários tecidos. É semicristalino (grau de cristalinidade por volta de 69 %), biodegradável e biocompatível, extensamente utilizado em inúmeras aplicações biomédicas, e apresenta custo reduzido [15, 29, 30].

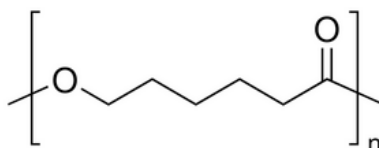


Figura 1.3 – Estrutura linear da poli(ε-caprolactona) [31]

É um poliéster alifático linear derivado da síntese química do petróleo e pode ser obtido através de policondensação do ácido 6-hidroxicapróico ou polimerização em cadeia (por abertura do anel) da ε-caprolactona. Resulta da repetição de unidades de hexanoato e é um polímero aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) [20, 26, 29, 30].

As suas características ímpares, nomeadamente as propriedades mecânicas, a sua elevada solubilidade e o seu baixo ponto de fusão, têm atraído os investigadores para o seu uso em biomateriais e engenharia de tecidos. A temperatura de fusão não é fixa e depende do grau de cristalinidade, que por sua vez depende do peso molecular: quanto menor for o peso molecular mais cristalino é, e vice-versa [27, 32]. É flexível e resistente, e a sua baixa viscosidade permite que seja facilmente processado (viscosidade intrínseca de $\eta=0,9 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ [29]). Também a sua toxicologia já está extensamente estudada, sendo actualmente considerado como não tóxico [33-35].

À temperatura ambiente, o PCL é altamente solúvel em clorofórmio, diclorometano, tetracloreto de carbono, e ligeiramente solúvel em acetona. O PCL exhibe também a rara propriedade de ser miscível com outros polímeros e de ser mecanicamente compatível com outros (como, o cloreto polivinílico ou o poliestireno acrilonitrilo [29]).

Hidroxiapatite

A hidroxiapatite - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ - é um biocerâmico bioactivo que faz parte do grupo das apatites, e que por sua vez é da família dos fosfatos de cálcio. A HAp é, de todas as apatites, a mais estável, constituída por iões fosfato, cálcio e carbonato, com uma razão Ca/P de 1,67. A HAp tem capacidade de adsorver vários iões e moléculas orgânicas, o que significa que

interagem dinamicamente com o tecido biológico. Em solução, a maioria dos fosfatos de cálcio convertem-se em produtos apatíticos [36, 37].

É dotada de boas características mecânicas para aplicação em tecidos duros, tais como elevada resistência e dureza à compressão, e geralmente conduzem a um incremento do módulo de Young quando inserida num compósito. A HAp sintética é quimicamente semelhante à fase mineral dos tecidos calcificados do organismo humano (osso, dentina e esmalte dentário) e por isso, exibe uma forte afinidade com os tecidos duros. Devido a esta capacidade, a ligação química da HAp com os tecidos ósseo ou dentário, constitui uma grande vantagem em aplicações clínicas, comparativamente a outros substitutos ósseos [18, 37].

1.2.2. Métodos de produção de *scaffolds*

Não só a escolha do material é importante, também a técnica de processamento deve ser adequada para a produção do *scaffold*, de modo a garantir que todas as características pretendidas para o *scaffold* sejam alcançadas. O método escolhido não deve interferir nas propriedades do material, nomeadamente nas suas propriedades químicas e na biocompatibilidade e deve ser capaz, entre outras, de conferir porosidade (interconectividade entre poros, dimensão de poro) adequada ao tecido a regenerar. De salientar ainda que as propriedades mecânicas dependem muito da técnica de produção escolhida [4].

De entre os métodos existentes, podemos enumerar como os mais utilizados, a lixiviação (*solvent casting*), inversão de fase (*phase inversion*), empacotamento de fibras (*fiber bonding*), tecnologias baseadas na fusão (*melt based technologies*), métodos baseados em alta pressão (*high pressure based methods*), liofilização (*freeze drying*) e a electrofiação (*electrospinning*) [4, 20]. As vantagens e desvantagens associadas a cada um destes métodos encontram-se apresentados na Tabela 1.2.

A electrofiação tem-se mostrado o método de eleição para a produção de *scaffolds* em variadas aplicações biomédicas, devido à sua simplicidade e versatilidade. Consiste na aplicação de um campo eléctrico à solução polimérica, provocando o alongamento da solução até à produção de um jacto que é recolhido num colector ligado à terra [13, 20].

Scaffolds à base de fibras electrofiadas possuem características topográficas desde a micro até à nanoescala, bem como porosidade adequada ao processo regenerativo. A elevada razão área de superfície/volume proporciona o aumento da adesão e proliferação celulares [13].

A formação de estruturas auto-organizadas por electrofiação tem sido reportada por alguns autores e atribuída a vários efeitos: presença de contas que inibem a deposição directa de novas fibras [38], o efeito do colector sobre as fibras [39, 40], acções competitivas entre a tensão superficial e a repulsão electrostática [41] e de fibras em estado húmido [41, 42], a

presença de uma distribuição bimodal do diâmetro das fibras [42] e a atracção e repulsão electrostáticas mediadas pelo grau de polarização das fibras [43]. Estas estruturas têm-se mostrado semelhantes à estrutura original de alguns tecidos, nomeadamente do tecido ósseo trabecular [8] e da dentina.

Tabela 1.2 – Vantagens e desvantagens de algumas técnicas de produção de *scaffolds* [4, 13, 20]

Método	Vantagens	Desvantagens
Lixiviação	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Estrutura de poros interconectados; ✓ Porosidade até mais de 90 %. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Não uniformidade dos poros; ✓ Podem-se formar estruturas compactas e não porosas; ✓ Uso de solventes tóxicos; ✓ Limitado em termos da espessura da membrana.
Inversão de fase	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Evita a deposição de sais que ocorre na lixiviação; ✓ Produção de amostras com mais de 3 mm. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Mesmas desvantagens da lixiviação, excepto a espessura das membranas.
Empacotamento de fibras	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Grande área de superfície do <i>scaffold</i>, promovendo a adesão celular e rápida difusão de nutrientes. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Dificil controlo da porosidade; ✓ Retenção de resíduos de solvente no <i>scaffold</i>.
Tecnologias baseadas em fundidos	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Produz estruturas 3D porosas, com várias formas, mudando apenas a geometria do molde. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Mesmas desvantagens relativas ao uso de um agente porogénico; ✓ Utilização de altas temperaturas.
Métodos baseados em alta pressão (CO₂ supercrítico)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Demonstram dar suporte ao crescimento celular de osteoblastos, deposição e mineralização da matriz extracelular do osso; ✓ Porosidade superior a 90 %; ✓ Poros com alguns milímetros de dimensão. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Baixas propriedades mecânicas; ✓ Superfície não porosa; ✓ Estrutura de poros fechados.
Liofilização	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Estrutura porosa; 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Baixa estabilidade mecânica; ✓ Necessidade de controlar muito bem os parâmetros do processo; ✓ Pequena dimensão dos poros.
Electrofiação	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Elevada razão área de superfície/volume; ✓ Elevada porosidade; ✓ Propriedades mecânicas ajustáveis; ✓ Simples e versátil; ✓ Custo acessível. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Necessidade de controlar os vários parâmetros do processo.

2. Materiais e Métodos

Este capítulo aborda os materiais e métodos experimentais que foram utilizados para a concretização deste trabalho, que se pode dividir em duas partes: a primeira consistiu na produção de membranas de PCL e de PCL/HAp a diferentes concentrações, num sistema de electrofiação comum, com um colector estático de alumínio (Al); e na segunda parte, produziram-se as espumas de PCL/HAp, com fracções de HAp distintas, através da utilização de um colector de teflon (Politetrafluoretileno, PTFE) com depressões, colocado sobre alumínio.

2.1. Materiais

2.1.1. Reagentes

Para a produção das membranas poliméricas utilizou-se policaprolactona da marca Sigma-Aldrich (PCL, Sigma-Aldrich: $(C_6H_{10}O_2)_n$, $M_n=70\ 000-90\ 000$ g/mol, determinado por GPC), o qual foi dissolvido numa solução de diclorometano (DCM, Valente e Ribeiro) e dimetilformamida (DMF, Merk: $M=73,1$ g/mol, $\rho=0,948-0,949$ kg/L). O solvente utilizado, consiste numa mistura de um solvente (DCM) e de um não-solvente (DMF), de modo a controlar melhor a taxa de evaporação do DCM. Para as membranas e espumas compósitas, utilizaram-se os mesmos compostos acima mencionados e nanoHAp, produzida através de HAp comercial (HAp, Sigma-Aldrich: $HCa_5O_{13}P_3$, $\geq 90\ \%$).

As partículas de HAp comercial possuem diâmetros da ordem dos micrómetros, o que para o processo de electrofiação não é muito favorável pois as fibras produzidas são nanométricas e assim HAp não ficaria impregnada nas fibras, tal como desejado. Além disso, poderia comprometer o processo de electrofiação através do entupimento da agulha. Para colmatar este problema e maximizar as propriedades das fibras compósitas, produziram-se nano-pós de HAp.

Para a produção da nanoHAp foi seguido o procedimento descrito por Chen *et al.* [44] através da nucleação dos nano-cristais numa solução aquosa super-saturada, a qual se encontra descrita no anexo A.

2.1.2. Preparação das soluções

Para este trabalho prepararam-se soluções de PCL de diferentes concentrações em DCM:DMF numa razão de 75:25. As concentrações usadas foram entre 1 e 7 % m/m de PCL no solvente referido (1, 3, 5 e 7 % m/m PCL). As soluções preparadas foram colocadas sob agitação magnética por 24 horas, de modo a garantir a dissolução completa do PCL no solvente.

Quanto às soluções de PCL/HAp, adicionou-se primeiro a nanoHAp ao solvente, deixando em agitação magnética por 24 horas. Posteriormente juntou-se o PCL a 7 % m/m e colocou-se novamente em agitação por mais 24 horas.

As soluções com HAp foram também previamente sonicadas (Hielscher UP400S) antes de serem submetidas ao processo de electrofiação, para uma melhor dispersão da nanoHAp. As concentrações de HAp escolhidas foram de 0, 5 e 10 % m/V aos 7 % m/m PCL. Foram estas as concentrações usadas também para a produção das espumas. Todas as soluções foram reservadas em frascos de âmbar e cobertos com parafilme, para evitar a evaporação do solvente.

Ao longo deste trabalho será utilizada a seguinte designação (Tabela 2.1):

Tabela 2.1 – Designação de cada concentração utilizada

Designação	Concentração
P1	1 % m/m PCL
P3	3 % m/m PCL
P5	5 % m/m PCL
P7	7 % m/m PCL
P7H5	7 % m/m PCL + 5 % m/V HAp
P7H10	7 % m/m PCL + 10 % m/V HAp

2.2. Métodos de produção

2.2.1. Processo de Electrofiação

A electrofiação tem como princípio básico a aplicação de um campo eléctrico a uma solução polimérica contida numa seringa com um capilar (ex: agulha) na sua extremidade. O esquema de montagem do processo de electrofiação encontra-se apresentado na Figura 2.1.

Como o PCL é um material dieléctrico (ou seja, não é condutor eléctrico), quando sujeito a um campo eléctrico externo, as suas moléculas ganham um momento dipolar eléctrico e diz-se que fica polarizado [45].

O grau de polarização de um material dieléctrico pode ser expresso através da seguinte equação [45]:

$$P = \varepsilon_0 \chi_e E \quad (2.1)$$

em que ε_0 é permissividade eléctrica no vácuo, χ_e é a susceptibilidade eléctrica e E é o campo eléctrico.

Devido à tensão eléctrica aplicada, o potencial electrostático do fluido aumenta, e consequentemente, a carga superficial do líquido também aumenta. A existência de um campo eléctrico aplicado entre o capilar e o colector ligado à terra (ou potencial zero) induz uma força eléctrica na gota, com componentes normal e tangencial, provocando o estiramento da mesma em direcção ao colector. Este estiramento da gota resulta do facto das forças eléctricas induzidas superarem a tensão superficial da solução, formando o cone de Taylor [14, 46-50].

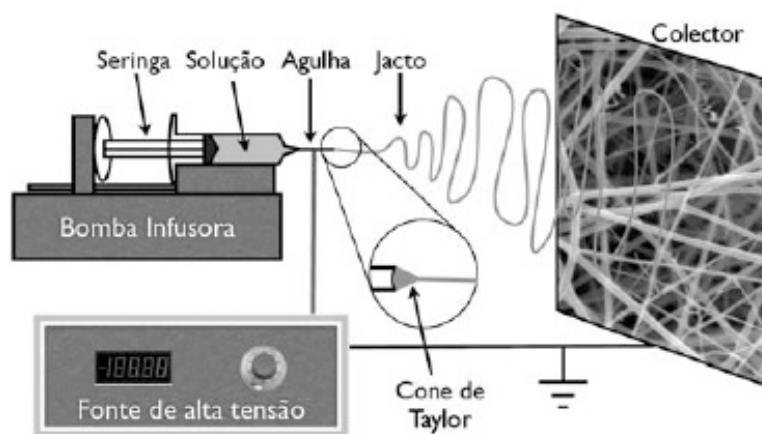


Figura 2.1 – Esquema de montagem do processo de electrofiação [51]

O caudal à saída do capilar é controlado através de uma bomba infusora. Quando a intensidade do campo eléctrico é baixa, a gota que emerge na extremidade da seringa é impedida de gotejar devido à tensão superficial da solução. À medida que a intensidade do campo eléctrico aumenta, as cargas induzidas na superfície do líquido, repelem-se e criam tensões de corte. Estas forças de repulsão actuam em direcção oposta à tensão superficial, o que resulta no estiramento da gota em forma de cone (Figura 2.2), que serve como uma superfície de iniciação. Assim que a tensão crítica é atingida, gera-se uma perturbação no equilíbrio das forças e um jacto carregado da ponta da gota cónica é projectado em direcção ao colector, depositando-se neste sobre a forma de fibras.

Geralmente, as fibras depositam-se aleatoriamente, originando a uma membrana não-tecida (*non-woven*). [14, 20, 48-52].

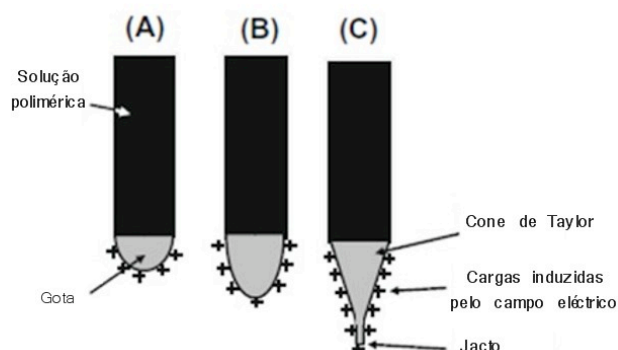


Figura 2.2 – Ilustração esquemática da formação do cone de Taylor: (A) As cargas superficiais são induzidas na solução polimérica devido ao campo eléctrico. (B) Alongamento da gota no capilar. (C) Deformação da gota para formar o cone de Taylor devido à repulsão das cargas. Um fino jacto inicia-se a partir do cone (adaptado de [52])

Existem muitos parâmetros controláveis do processo, o que torna esta técnica um pouco mais complicada em termos de processamento. Podemos referir como parâmetros que influenciam as características finais das fibras, os da solução, do processo em si e os ambientais. No que respeita aos parâmetros da solução, destacam-se o peso molecular, a viscosidade, a tensão superficial, a condutividade da solução e o solvente utilizado. Quanto aos parâmetros do processo, há que referir o caudal da solução (controlado pela bomba infusora), a distância ao colector, a tensão aplicada, efeito do colector e o diâmetro interno da agulha. Por último, quanto aos parâmetros ambientais, a temperatura e a humidade serão aqueles que poderão influenciar mais nas fibras obtidas [20, 30, 47, 49, 52]. Estes parâmetros serão discutidos de seguida.

Parâmetros da solução

❖ Peso molecular

O peso molecular do polímero dá-nos informação do tamanho da cadeia polimérica, e quanto maior for, maior é o tamanho da cadeia. Tendo em conta que o tamanho da cadeia determina o grau de emaranhamento das cadeias poliméricas, que será tanto maior quanto maior for o tamanho das mesmas, este factor terá influência directa na viscosidade das soluções poliméricas. Além disso tem também um ligeiro efeito na tensão superficial. Deste modo, aumentando o peso molecular do polímero, o diâmetro das nanofibras tende também a aumentar [30, 49, 50].

❖ Viscosidade

A viscosidade da solução depende fortemente da concentração da solução polimérica. Quanto maior for a concentração da solução, maior será a sua viscosidade. Por outro lado, tal como já foi referido anteriormente, o peso molecular do polímero influencia a viscosidade. Consequentemente, quanto maior for o peso molecular do polímero, para a mesma concentração, maior será a viscosidade da solução.

Para que o processo de electrofiação seja bem-sucedido, a viscosidade não poderá ser nem muito elevada, nem muito baixa. Para baixos valores de viscosidade existe um grande número de moléculas de solvente para a quantidade de polímero (Figura 2.3 (A)), o que se traduz no domínio da tensão superficial ao longo do jacto. Assim, a solução fluirá livremente pela agulha, e quando sujeita ao campo eléctrico, poderá ocorrer *electrospray*, e ainda conduzir à formação de contas nas fibras. Pelo contrário, se a viscosidade da solução for muito elevada, a solução não flui ao longo da seringa e tende a acumular e a secar na ponta do capilar, antes de iniciar o processo. Perante este caso torna-se muito difícil obter fibras, uma vez que não é possível electrofiar. Nesta situação, as forças viscoelásticas sobrepõem-se à tensão superficial, resultado de um maior número de entrelaçamentos da cadeia polimérica (Figura 2.3 (B)).

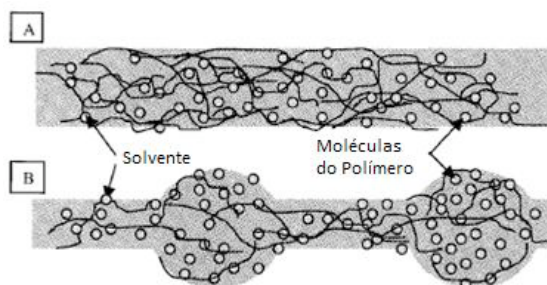


Figura 2.3 – Solução polimérica com (A) elevada viscosidade, em que as moléculas de solvente estão distribuídas pelas moléculas poliméricas entrelaçadas e (B) baixa viscosidade, em que as moléculas de solvente, que tendem a aglomerar-se devido à acção da tensão superficial [30]

Para o intervalo de valores de viscosidade em que é possível electrofiar é preciso estar ciente de que modo é que esta influencia a morfologia das fibras. Para maiores viscosidades, as fibras tendem a ter maiores diâmetros e o inverso sucede para menores viscosidades. Isto ocorre pois, com o aumento da viscosidade, as forças viscoelásticas começam a sobrepôr-se à tensão superficial, havendo uma maior oposição ao estiramento. Observa-se, também, uma alteração gradual na morfologia das contas, que passam de uma forma esférica para uma forma mais achatada, os fusos. A Figura 2.4 ilustra a morfologia das contas nas fibras e como estas mudam com a viscosidade. Além disso, verifica-se uma menor área de deposição das fibras, uma vez

que esta tende a diminuir a instabilidade do jacto, reduzindo consequentemente o raio do correspondente cone (envelope) [30, 47, 48, 50-53].

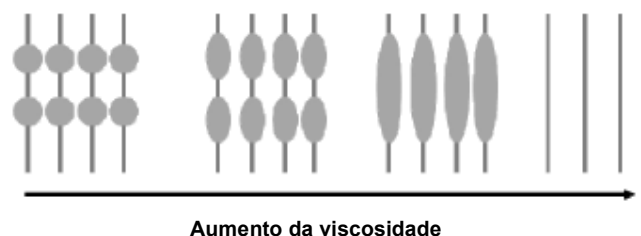


Figura 2.4 – Imagem esquemática do efeito do aumento da viscosidade da solução polimérica na morfologia das fibras resultantes por electrofiação (adaptado de [53])

❖ Tensão superficial

A tensão superficial é responsável pela manutenção da forma esférica de um líquido, e depende essencialmente da composição do solvente utilizado para dissolver o polímero, mas também da natureza e concentração do polímero. O processo de electrofiação inicia-se quando a tensão superficial é vencida, conduzindo à formação de um jacto. Contudo, ao longo do trajecto do jacto até ao colector, poderá ocorrer a formação de contas. Isto deve-se ao facto das moléculas de solvente livres terem tendência a aglomerar-se devido à tensão superficial, adoptando uma forma esférica. Caso a tensão superficial seja muito elevada, a solução poderá ser dividida em gotas (*electrospray*).

Por outro lado, se se aumentar a concentração da solução, e por conseguinte a sua viscosidade, a interacção entre as moléculas do solvente e do polímero aumenta, resultado do maior número de cadeias entrelaçadas. Assim, ao aplicar-se a tensão à solução, esta é esticada e as moléculas do solvente irão difundir-se pelas cadeias entrelaçadas do polímero, reduzindo a tendência para que as moléculas do solvente se agreguem devido à tensão superficial. Além disso, também a formação de contas nas fibras irá diminuir e a área superficial por unidade de massa de fluido irá aumentar. A adição de um surfactante à solução também permite a redução da tensão superficial. Desta forma, uma solução com uma tensão superficial relativamente reduzida favorece a obtenção de nanofibras sem contas [30, 48, 50, 51].

❖ Condutividade da solução

A electrofiação envolve a aplicação de um campo eléctrico à solução. Por isso, a condutividade da solução influencia directamente o processo e depende maioritariamente da composição do solvente utilizado.

Tal como referido na descrição do processo, o estiramento da solução é o resultado da repulsão entre as cargas superficiais. Quanto maior for a quantidade das cargas transportadas (i. e. maior condutividade), maior será a repulsão electrostática e por conseguinte, maior o estiramento. Deste modo, uma maior condutividade da solução conduz à formação de fibras mais finas e sem contas, pois um maior estiramento evita a formação de aglomerados da solução. Inversamente, baixos valores de condutividade irão propiciar a formação de contas, resultante de um estiramento incompleto do jacto [30, 48, 50-52].

❖ Solvente

A escolha do solvente no processo de electrofiação é também muito importante. Deverá ter-se em conta a solubilidade do polímero no solvente, mas também a sua volatilidade, ou seja, a sua taxa de evaporação.

Assim, solventes mais voláteis, como é o caso da acetona, poderão evaporar mesmo antes de se iniciar o processo de electrofiação, solidificando a solução na ponta da agulha, o que conduz à não obtenção de fibras. Por outro lado, solventes muito pouco voláteis poderão não ter tempo de evaporar antes de chegar ao colector, originando a fusão de fibras quando colectadas.

De salientar também, que a taxa de evaporação do solvente, seja o solvente muito volátil ou não, é influenciada por parâmetros ambientais, que serão discutidos adiante [47, 48, 50, 51].

As características do solvente, tais como o momento dipolar eléctrico e a constante dieléctrica, têm vindo a mostrar também influência na morfologia das fibras (diâmetros e defeitos). O aumento destes valores conduzem geralmente à redução dos diâmetros das fibras e de defeitos [26, 54, 55].

Parâmetros de produção

❖ Caudal da solução

O caudal da solução diz respeito à quantidade de solução que chega à agulha e que está disponível para ser ejectada pela força exercida pelo campo eléctrico sobre a solução carregada. Se o caudal for demasiado pequeno, poderão ocorrer interrupções no jacto como resultado da insuficiente quantidade de solução na ponta da agulha. Se o caudal for demasiado elevado, a solução poderá acumular-se na ponta da agulha, uma vez que a taxa de extracção da solução polimérica é incapaz de remover a quantidade de solução disponível na mesma.

Por isso, é importante estabelecer um intervalo de valores de caudal para que o processo de electrofiação possa ocorrer e tipicamente obtêm-se diâmetros ou contas maiores com o aumento do caudal. Além disso, como o volume de solução é maior, o solvente irá demorar mais tempo a evaporar e por isso o jacto necessitará de um maior tempo de voo para solidificar. Caso contrário, poderá ocorrer a fusão das fibras devido à presença do solvente residual, produzindo-se um filme [30, 48, 50-52].

❖ Distância agulha-colector

A distância entre a agulha e o colector influencia essencialmente o tempo de voo da solução e a evaporação do solvente, isto é, para a mesma tensão aplicada, o tempo de voo será menor para distâncias mais pequenas.

A morfologia das fibras só pode ser alterada antes da completa evaporação do solvente, uma vez que a partir desse momento as fibras não podem ser mais estiradas, mesmo em voo, carregadas e sujeitas ao campo eléctrico. Isto significa que o estiramento das fibras deverá ocorrer antes das forças viscoelásticas se tornarem dominantes, não permitindo que as fibras sejam mais estiradas. Diz-se, por isso, que as fibras, após a evaporação completa do solvente, ficam morfologicamente “congeladas”.

Uma distância pequena implica um tempo de voo menor, mas também um campo eléctrico maior, para a mesma tensão aplicada. Isto contribui para que o tempo de voo seja ainda menor devido à maior aceleração do jacto, e o solvente pode não ter tempo suficiente para evaporar, dando origem à fusão de fibras quando colectadas e consequente deposição de fraca qualidade. Para maiores distâncias o solvente poderá evaporar mais eficientemente. Contudo, é necessário haver um campo eléctrico suficientemente intenso para que as fibras cheguem ao colector. Caso contrário, pode mesmo ser impossível obtê-las [30, 48, 50, 51].

❖ Tensão aplicada

A tensão aplicada à solução polimérica é um parâmetro que se encontra intimamente ligado ao princípio básico de funcionamento da electrofiação. A alta tensão é responsável por induzir as cargas necessárias para que a força electrostática supere a tensão superficial, iniciando o processo de electrofiação. Para tal, é necessário aplicar um valor mínimo de tensão (tensão crítica) que permita deformar a gota da solução na ponta da agulha, até formar o cone de Taylor e iniciar o processo.

A preservação do cone de Taylor (Figura 2.2) é muito importante e depende essencialmente do balanço entre o potencial aplicado e o caudal da solução. A aplicação de

potenciais mais elevados originam um cone de Taylor mais pequeno e menos estável e, caso a taxa de extracção seja maior do que a taxa de infusão por parte da bomba, o cone de Taylor não se forma (pois não se forma a gota) e o jacto passa a emergir do interior da agulha. Além disso, há um aumento das cargas da solução polimérica, assim como um maior campo eléctrico estabelecido entre a agulha e o colector.

Tal como já foi abordado anteriormente, aumentar o campo eléctrico conduz ao aumento da aceleração das fibras até chegarem ao colector, originando tempos de voo curtos, menor zona de instabilidade, menor estiramento do jacto, e consequentemente, maior diâmetro das fibras. Por outro lado, um campo eléctrico maior conduz também a um maior número de cargas presentes no jacto, e por conseguinte maior auto-repulsão ao longo do jacto, aumentando assim o estiramento do mesmo – fibras com menores diâmetros. Por isso, aumentando a tensão, poderá ocorrer o aumento ou a diminuição do diâmetro das fibras [30, 48, 50-52].

❖ Efeito do colector

A placa colectora nos sistemas de electrofiação é geralmente feita de um material condutor, como uma folha de alumínio, de forma a facilitar a dissipação das cargas residuais transportadas pelas nanofibras. Com a presença de um colector condutor, a dissipação das cargas das primeiras fibras depositadas são mais facilmente dissipadas e desta forma não exercem tantas forças de repulsão sobre as fibras subsequentes.

A placa é ligada à terra para que a diferença de potencial entre a fonte o colector seja estável. Existem colectores estáticos e rotativos, em que o movimento do mesmo influencia essencialmente a organização estrutural das fibras. Assim, um colector estacionário conduz à formação de uma membrana não-tecida, enquanto que um colector rotatório permite a obtenção de fibras alinhadas [30, 50, 53]. Na Figura 2.5 é possível ver alguns tipos de colectores usados.

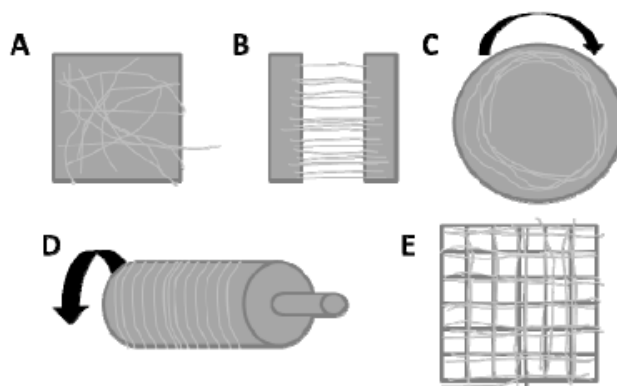


Figura 2.5 – Diferentes geometrias de colectores: (A) placa estática; (B) eléctrodos paralelos; (C) disco rotativo; (D) cilindro rotativo; (E) grelha [53]

❖ Diâmetro interno da agulha

Quanto ao diâmetro interno da agulha utilizada, quanto menor for, menor é a probabilidade de entupimento da agulha, devido à menor exposição da solução à atmosfera durante o processo de fiação. O inverso sucede para diâmetros internos maiores [30, 50].

Parâmetros ambientais

❖ Temperatura

O ambiente que circunda o jacto polimérico, nomeadamente a temperatura, afecta a taxa de evaporação do solvente e a viscosidade da solução polimérica. Assim, uma menor temperatura conduz à diminuição da taxa de evaporação do solvente e por sua vez, à diminuição da viscosidade da solução. Consequentemente, com uma menor viscosidade obtêm-se fibras com menores diâmetros, pois as forças viscoelásticas diminuem fazendo com que as forças electrostáticas produzam um estiramento efectivo do jacto. Por outro lado, o aumento da taxa de evaporação do solvente promove a formação de nanofibras com maior diâmetro devido ao aumento da viscosidade do jacto. Além disso, verifica-se uma redução na ocorrência de fusão de pontos de contacto, como consequência da presença de solventes residuais nas nanofibras colectadas [30, 50].

❖ Humidade

Durante o processo de electrofiação, uma porção das cargas presentes no jacto é descarregada para as moléculas de vapor de água na atmosfera, que possuem uma elevada constante dieléctrica ($\epsilon_r=80$). Desta forma, a dissipação das cargas no jacto é facilitada pela presença das moléculas de água [55].

Se a humidade relativa (HR) é baixa, existem menos moléculas de vapor de água disponíveis para descarregar electricamente o jacto polimérico. Esta deficiente dissipação de cargas conduz a um aumento da densidade de cargas nas fibras, que poderá levar à ruptura das mesmas – maior estiramento das fibras depois de evaporação suficiente do solvente. Se a humidade relativa for alta, poderão surgir fibras com uma superfície porosa causada por uma separação de fases induzida pelo vapor (Vapor-Induced Phase Separation, VIPS) [55].

Habitualmente, a presença de polímeros hidrofóbicos, elevada volatilidade do solvente e a miscibilidade do solvente com a água, é necessário para facilitar esta separação. Quando a água é introduzida na solução, o polímero hidrofóbico precipita, criando zonas ricas e pobres em

polímero no interior do jacto. A rápida evaporação do solvente provocada por solventes altamente voláteis, resulta em fibras com superfícies porosas [55, 56].

2.2.1.1. Montagem

Para processo de electrofiação deste trabalho, utilizou-se primeiro um colector de alumínio e depois, um colector de teflon com fundo de alumínio.

Inicialmente produziram-se membranas de PCL e PCL/HAp num colector estático feito de alumínio, o qual foi revestido por folha de alumínio comercial. Posteriormente elaborou-se um colector de teflon com pequenas depressões cilíndricas (10 mm de diâmetro e 2 mm de altura) colocado sobre uma placa de alumínio, de forma a produzirem-se as espumas porosas (Figura 2.6).

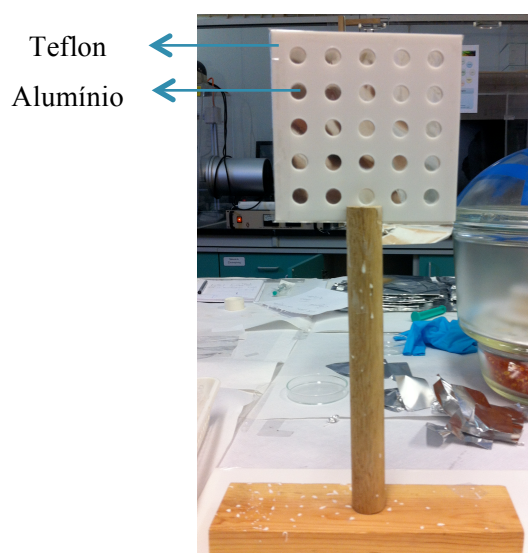


Figura 2.6 – Imagem do colector de depressões utilizado, em que as depressões têm dimensões $\varnothing = 10 \text{ mm}$ e $e = 2 \text{ mm}$, com uma área total de $11 \times 11 \text{ mm}^2$

Para a colocação da solução na seringa teve-se o cuidado de evitar que a mesma ficasse com bolhas de ar, o que iria provocar a interrupção do jacto aquando do processo de electrofiação e consequente alteração na deposição das fibras no colector.

Os parâmetros do processo foram cuidadosamente controlados e apresentam-se na tabela seguinte (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 – Parâmetros de electrofiação utilizados na produção das membranas e das espumas

	Tensão (kV)	Caudal (mL/h)	Distância ao colector (cm)	Humidade (%)	Temperatura (°C)	Tempo de deposição (h)
Membranas	10-20	0,15-0,75	10-20	30-60	≈25	1-4
Espumas	20-25	0,75	11	50-60	≈25	5

O equipamento de electrofiação usado é composto por uma bomba infusora da kd Scientific e por uma fonte de alta tensão da Glassman High Voltage (0-30 kV).

2.3. Métodos de caracterização

2.3.1. Medição da condutividade das soluções

De modo a avaliar a condutividade das soluções de PCL, mediram-se as respectivas condutividades com um condutímetro da HANNA Instruments (HI 4521). Como calibração, utilizou-se uma solução da HANNA Instruments (HI 7033), que possui uma condutividade de 84 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25 °C. Para a medição da condutividade de cada solução, o eléctrodo do condutímetro foi devidamente lavado e calibrado, evitando erros nas medições.

2.3.2. Medição da viscosidade das soluções

A reologia é a ciência que estuda a deformação e o escoamento da matéria: corpos sólidos ou fluidos (gases ou líquidos) [57].

A viscosidade de um fluido é uma medida da resistência que oferece ao seu escoamento, devido a uma deformação causada por uma tensão ou taxa de corte. Na maioria dos fluidos, a viscosidade depende de alguns factores, nomeadamente a sua composição e a temperatura [57-59].

Podemos definir matematicamente a viscosidade como a razão entre a tensão de corte (τ) e a taxa de corte ($\dot{\gamma}$), isto é [57, 59, 60]:

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (2.2)$$

Num gráfico em que a tensão de corte em função da taxa de corte segue uma proporcionalidade directa (linear), em condições de temperatura e pressão constantes, a viscosidade será constante e igual ao coeficiente angular da recta. Um líquido que possui este tipo de comportamento diz-se que é Newtoniano [57, 59-61].

Os materiais que não seguem esta lei designam-se fluidos não-Newtonianos. Muitas soluções poliméricas (especialmente as de elevada concentração) e dispersões (por exemplo, partículas em disco ou bastão) possuem este tipo de comportamento devido, essencialmente, à formação de uma estrutura organizada e à orientação das partículas assimétricas na direcção do fluxo, causada pelo gradiente de velocidade [57, 59, 60].

Nos sistemas não-Newtonianos a razão $\tau/\dot{\gamma}$ designa-se de viscosidade aparente, uma vez que o seu valor depende da tensão de corte aplicada. Nos sistemas não-Newtonianos podemos distinguir os fluidos cuja viscosidade é independente do tempo e outros em que a viscosidade é dependente do tempo (Tabela 2.3) [57-61].

O comportamento dos líquidos pseudoplásticos em suspensões coloidais resulta do fraccionamento de agregados de partículas e da orientação de partículas assimétricas provocadas pelo aumento da taxa de corte. A baixas tensões de corte, o fluido tende a ter um comportamento Newtoniano [57-61].

Tabela 2.3 – Comportamento típico de fluidos não-Newtonianos [57-61]

Fluidos não-Newtonianos		Comportamento
Independentes do tempo	Pseudoplásticos	A viscosidade aparente diminui com o aumento da taxa de corte.
	Plásticos	Existe uma tensão de corte mínima (τ_0) para que o fluido comece a escoar. Para tensões de corte superiores a τ_0 , a viscosidade aparente diminui com o aumento da taxa de corte.
	Dilatantes	A viscosidade aparente aumenta com o aumento da taxa de corte
Dependentes do tempo	Tioxotrópicos	A viscosidade aparente diminui ao longo do tempo, a uma taxa de corte constante.
	Reopéticos	A viscosidade aparente aumenta ao longo do tempo, a uma taxa de corte constante.

Já no caso dos materiais plásticos, quando a tensão mínima de escoamento é muito pequena, torna-se difícil determinar se o sistema é plástico ou pseudoplástico. A plasticidade deve-se, essencialmente, à existência de um retículo estrutural contínuo na amostra em repouso e que deve ser rompido para que o fluido possa escoar [57, 59].

Na Figura 2.7 pode-se visualizar o comportamento típico de fluidos Newtonianos e não-Newtonianos.

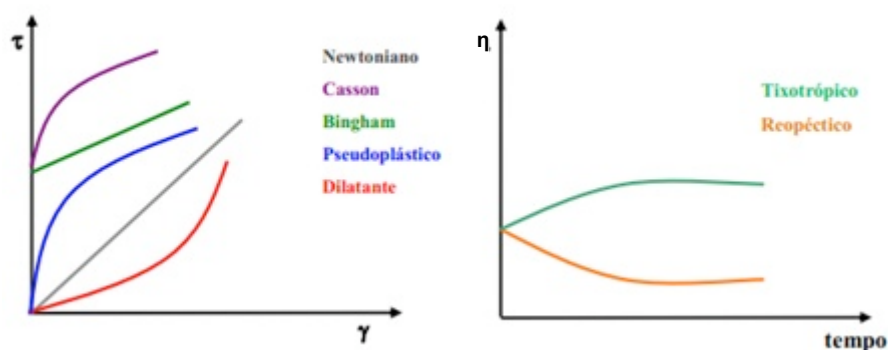


Figura 2.7 – Curvas características de fluidos Newtonianos e não-Newtonianos independentes do tempo (à esquerda), e não-Newtonianos dependentes do tempo (à direita) [62]

Existem quatro tipos de viscosímetros: viscosímetro capilar, de orifício, rotacional e de esfera. A escolha do viscosímetro depende da medida que se pretende obter e do tipo de líquido a ser investigado [57, 59]. Neste trabalho o viscosímetro utilizado foi o rotacional.

Num viscosímetro rotacional, a viscosidade é medida através da velocidade angular de uma parte móvel separada de uma parte fixa, pelo líquido. Nestes viscosímetros podemos encontrar mais do que uma geometria, como a geometria de cone-prato, em que o cone gira sobre o líquido que se encontra colocado sobre um prato fixo (Figura 2.8). O prato utilizado deve ter dimensões tais que evite que a solução não chegue às bordas do mesmo, principalmente em soluções diluídas, como é o caso deste trabalho [57, 63].

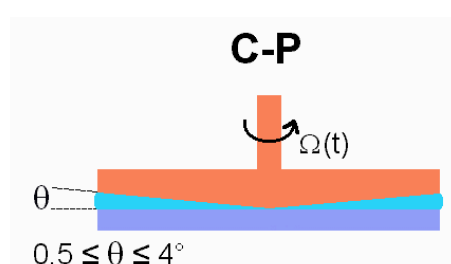


Figura 2.8 – Viscosímetro rotacional cone-prato [63]

Para a medição da viscosidade das soluções utilizou-se um reómetro rotacional da Bohlin Gemini HR^{NANO}. A geometria utilizada foi cone e prato, 1° 50 mm (C/P – 1°/50mm), onde foram colocadas as soluções (cerca de 1 mL de cada solução). As medições foram realizadas a 25 °C em estado estacionário, com taxas de corte entre 0,1 s⁻¹ – 1000 s⁻¹.

2.3.3. Porosidade das espumas

A porosidade é uma medida do espaço vazio de um material e é dada pela razão entre o volume vazio e o volume total da amostra. Para averiguar sobre a porosidade das espumas produzidas, recorreu-se ao conceito de porosidade aparente, que pode ser determinada teoricamente a partir da seguinte expressão [16]:

$$Porosidade = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_m} \quad (2.3)$$

em que ρ_a é a densidade aparente da matriz (razão entre a massa e o volume total da amostra, $\rho_a = \frac{m}{V}$) e ρ_m é a densidade do material (neste caso, do PCL ou do compósito PCL/HAp).

A densidade do material compósito pode ser calculada através da seguinte expressão:

$$\rho_m = \rho_{compósito} = \frac{m_{compósito}}{V_{compósito}} = \frac{m_{PCL} + m_{HAp}}{V_{PCL} + V_{HAp}} = \frac{m_{PCL} + m_{HAp}}{\frac{m_{PCL}}{\rho_{PCL}} + \frac{m_{HAp}}{\rho_{HAp}}} \quad (2.4)$$

Como a densidade dos pós de HAp era desconhecida, recorreu-se ao método de Arquimedes para a determinar.

2.3.4. Composição química

A Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (do inglês, *Fourier Transformed Infrared spectroscopy*, FTIR) é um método qualitativo que consiste na absorção (ou transmissão) da radiação, a determinado comprimento de onda, por parte do material [64, 65].

Cada material é composto por ligações químicas características, ligações essas que têm frequências de vibração específicas e que correspondem a níveis de energia da molécula (níveis vibracionais). Quando a amostra recebe radiação com a mesma energia ($E = h\nu$, onde h é a constante de *Planck* e ν , a frequência) de uma dessas vibrações, a radiação é absorvida, contribuindo assim, para o espectro medido através de picos que identificam os grupos funcionais da amostra [64].

A constituição química das membranas produzidas (uma apenas com PCL e outra com PCL+HAp) e os pós de HAp, foi avaliada através de um espectómetro da marca FTIR Nicolet 6700 – Thermo Electron Corporation com o sistema de ATR (*Attenuated total reflectance*).

Antes de se proceder à aquisição dos espectros de absorção, foi realizada uma linha base por meio de uma aquisição *background*, permitindo que todos os compostos exteriores à amostra em estudo, não fossem contabilizados no espectro. Após registada a linha base, cada amostra foi colocada no porta-substratos e adquiridos os respectivos espectros.

2.3.5. Análise morfológica das membranas e das espumas

Para a análise morfológica das membranas e espumas recorreu-se à Microscopia Electrónica de Varrimento (do inglês, *Scanning Electron Microscopy*, SEM). Para a análise morfológica das membranas e espumas recorreu-se à Microscopia Electrónica de Varrimento (do inglês, *Scanning Electron Microscopy*, SEM). O seu princípio de funcionamento baseia-se na incidência de um feixe focado de electrões, altamente energético, num ponto da superfície da amostra-alvo. Os sinais electrónicos emitidos pelo material-alvo são sequencialmente recolhidos através de um *scan*. O feixe ao interagir com a amostra, conduz à emissão de electrões secundários utilizados na formulação da imagem da amostra [60, 66].

A morfologia das membranas e espumas produzidas foi observada com um equipamento SEM da Zeiss DSM-962. As amostras foram colocadas sobre fita de carbono e cobertas com ouro (espessura de 8 nm), por forma a aumentar a condutividade das fibras. Para a visualização de um corte axial de uma espuma, as amostras foram mantidas em água por 24 horas e congeladas com azoto antes de se cortarem com um bisturi e postas a liofilizar. A deposição de ouro foi feita com um aparelho de *sputtering* durante 30 segundos, a uma taxa de deposição de 3 Å/s. A tensão aplicada de modo acelerar os electrões e permitir a observação das amostras foi de 5 kV.

Os diâmetros das fibras produzidas foram medidos com o auxílio do *software* ImageJ, assim como a dimensão dos favos. O ImageJ permite determinar a área e perímetro de formas sem uma geometria específica. Com os dados fornecidos por este software é possível estimar a dimensão dos favos, recorrendo o conceito de diâmetro equivalente circular (diâmetro EC). Este diâmetro é definido como o diâmetro de um círculo equivalente com a mesma área da forma detectada sob análise [43]:

$$\text{diâmetro EC} = 2\sqrt{\frac{\text{Área}}{\pi}} \quad (2.5)$$

De modo a ter uma estatística fiável, foram medidos 50 diâmetros de fibras e 25 diâmetros EC de favos.

2.3.6. Avaliação da bioatividade

A mineralização é um processo muito importante em meio biológico, através da qual é produzida uma substância inorgânica. Este processo ocorre em materiais bioativos como a HAp. Devido a esta característica, os osteoblastos proliferam sobre os cristais apatíticos que se formam na sua superfície [67].

Cerâmicos bioativos, tais como a HAp, quando implantados em defeitos ósseos, formam espontaneamente, na sua superfície, uma camada apatítica semelhante à do osso. Esta camada é biologicamente activa e induz a integração química do tecido ósseo [5, 30, 68].

A figura seguinte (Figura 2.9) ilustra um esquema do processo de formação destes cristais apatíticos na superfície óssea.

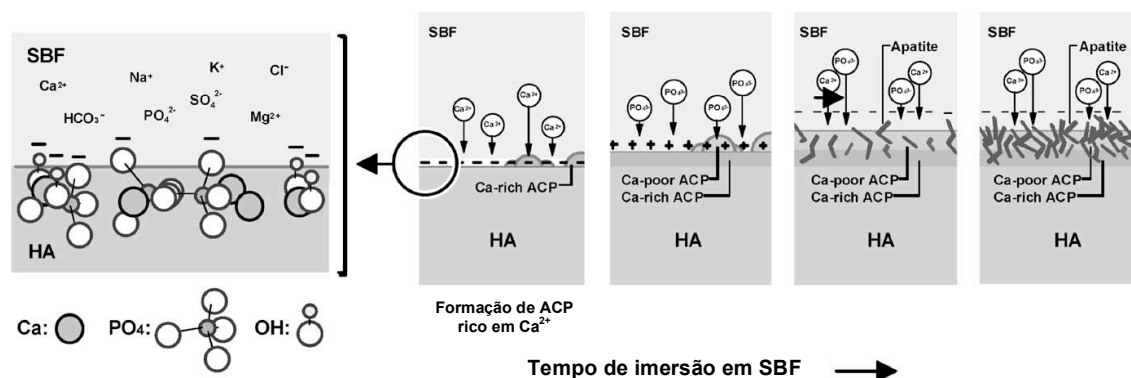


Figura 2.9 – Esquema da origem das cargas negativas à superfície da HAp e do processo de formação de apatites no osso, numa solução de SBF (adaptado de [67])

Por forma a avaliar se as membranas compósitas tinham capacidade de mineralização, ou seja, se eram bioativas, submergiram-se as mesmas numa solução salina (*Simulated Body Fluid*, SBF), as quais permaneceram por 6 dias. A solução foi substituída todos os dias.

O SBF é uma solução com uma concentração de iões próxima da do plasma humano, mantido a condições de pH e temperatura fisiológicas idênticas [68]. O procedimento seguido para a produção da solução encontra-se em anexo a este trabalho (Anexo B).

A bioatividade das membranas foi posteriormente avaliada a partir da sua observação por SEM, preparando-se as amostras tal como descrito no ponto 2.3.5..

2.3.7. Ensaio de compressão

Para os ensaios mecânicos das espumas, recorreram-se a testes para avaliar a resistência das mesmas quando comprimidas. Estes ensaios permitem fazer uma avaliação sobre as forças moleculares que regem as características mecânicas das espumas, com e sem a adição de HAp.

A compressão de um material é o resultado da aplicação de forças de compressão, dando origem a uma redução de volume ou de uma das suas dimensões, quando as forças aplicadas são unidireccionais (Figura 2.10). Neste caso, aplicou-se uma força axial às espumas, ou seja, longitudinalmente, pelo que haverá uma diminuição do comprimento do eixo e um aumento da secção transversal, mantendo-se constante o respectivo volume. À tensão aplicada numa só direcção ao longo do eixo axial designa-se por tensão uniaxial, σ , e define-se como o quociente entre a carga (ou força) aplicada, F (N), e a área, A (m^2), perpendicular (ou transversal) à força aplicada, isto é [32]:

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad \left(\frac{N}{m^2} = Pa \right) \quad (2.6)$$

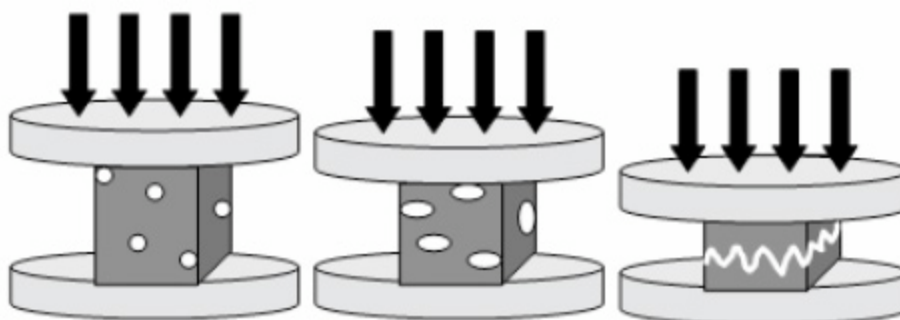


Figura 2.10 – Esquema da alteração da morfologia do material e dos poros durante um ensaio de compressão [69]

A deformação axial do material resultante da aplicação da carga, define-se como a razão entre a variação de comprimento sofrida, Δl (m), e o seu comprimento inicial, l_0 (m), ou seja [32]:

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0} \quad (2.7)$$

A esta deformação dá-se o nome de extensão.

Assim, a partir do registo das forças aplicadas e respectivas deformações é possível construir um gráfico de tensão versus extensão e avaliar o comportamento mecânico do material ao longo do ensaio e a sua resistência até à ruptura [32].

A Figura 2.11 mostra uma curva de compressão típica de uma espuma, sendo possível distinguir três zonas distintas: zona de deformação elástica, patamar de colapso e a zona de densificação [70].

A zona elástica constitui a região em que a parede da célula sofre flexão e é possível recuperar, na totalidade, a deformação a que o material foi sujeito. Nesta região, a lei que rege este comportamento é a lei de Hooke, através da expressão [32, 70]:

$$\sigma = E\varepsilon \quad (2.8)$$

em que E (Pa) é o módulo de Young ou constante elástica e ε é a extensão.

A deformação elástica tem um máximo, obtido para uma tensão designada por tensão de escoamento, a partir da qual, parte da deformação passa de recuperável a permanente. A este tipo de deformação chama-se deformação plástica, e inclui o patamar de colapso e a zona de densificação [32, 70, 71].

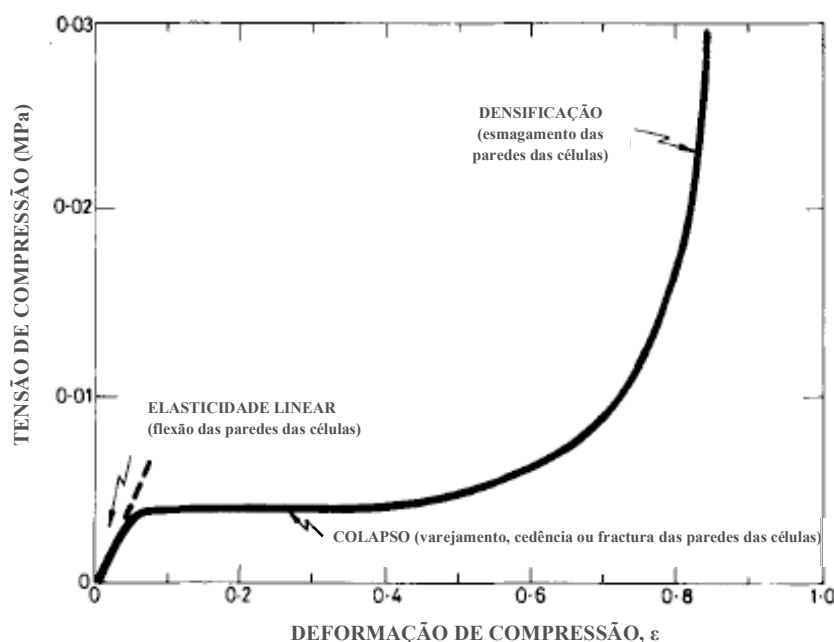


Figura 2.11 – Curva típica de compressão de uma espuma (adaptado de [70])

O patamar de colapso ocorre após a zona elástica e caracteriza-se pelo varejamento, cedência ou fractura das paredes das células. Nesta região a tensão mantém-se praticamente constante com o aumento da deformação, ou seja, é um patamar de deformação. Por fim, a zona de densificação, em que as paredes das células se esmagam todas juntas, é caracterizada por um aumento abrupto da tensão com a deformação do material [70, 71].

A figura seguinte (Figura 2.12) mostra o esquema de uma célula unitária de um sólido celular, segundo o modelo de Gibson-Ashby [70].

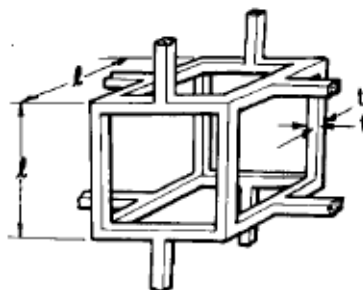


Figura 2.12 – Esquema de uma célula (aberta) unitária de um sólido celular [70]

Para avaliar as propriedades mecânicas das espumas, foram realizados testes de compressão de quatro amostras para cada concentração (P7, P7H5 e P7H10). Estes testes foram feitos num equipamento da Rheometric Scientific (Minimat Firmware 3.1) com uma célula de carga de 20 N e velocidade 2 mm/min.

2.3.8. Testes de adesão e de citotoxicidade das espumas

Visto que as espumas se destinam a aplicações de Engenharia de Tecidos e Medicina Regenerativa de tecido ósseo, foi necessário proceder a testes de citotoxicidade *in vitro* de modo a comprovar a sua compatibilidade celular. Nestes testes foram usados osteoblastos de origem humana da linha Saos-2 (SIGMA, ATCC Catalog Nº HTB-85).

O método adoptado neste trabalho para testar a compatibilidade celular, consiste em determinar a viabilidade das células que foram semeadas sobre o material. Para obter o número de células presentes, foi utilizado o reagente *Presto Blue*. As enzimas mitocondriais das células vivas convertem o reagente (resazurina) na sua forma reduzida (resorufina), que é detectada calorimetricamente [72].

Para proceder à cultura celular, as amostras foram fixadas num suporte de teflon e colocadas numa placa de 24 poços. As amostras foram esterilizadas com isopropanol a 70 %. Foram preparadas quatro amostras por cada concentração (P7, P7H5 e P7H10). Posteriormente, foi adicionada, em cada poço, uma solução salina (PBS) por forma a melhorar a permeabilidade das amostras, deixando-a actuar por 24 horas.

O meio de cultura (McCOY'S 5A MEDIUM) foi também previamente preparado (Anexo C), tendo-se adicionado ao meio, soro fetal bovino (10 %) e antibióticos (penicilina e estreptomicina a 1 % V/V). As células foram semeadas com uma concentração de 20 000 células/cm². Adicionaram-se 200 µL de meio de cultura em cada um dos poços que continham

as amostras, bem como aos 4 poços que serviram de controlo celular (Figura 2.13). As células foram colocadas numa incubadora de CO₂ a 37 °C.

Para realizar os testes de citotoxicidade adicionaram-se 10 % V/V de PrestoBlue™ (Invitrogen) ao meio de cultura. De seguida, a placa foi colocada na incubadora por 2 horas e medidas as absorvâncias do meio com a resazurina metabolizada, com o auxílio de um leitor de microplacas Biotek ELX 800UV.

As lavagens foram realizadas com PBS enriquecido com Ca²⁺ e Mg²⁺ para preservar a adesão das células à superfície. Para posterior avaliação por SEM, as células foram fixadas através da adição de glutaraldeído (Sigma-Aldrich) a 2,5 %, seguido de lavagens com etanol (a 50, 70 e 90 %, CH₃CH₂OH, Panreac).

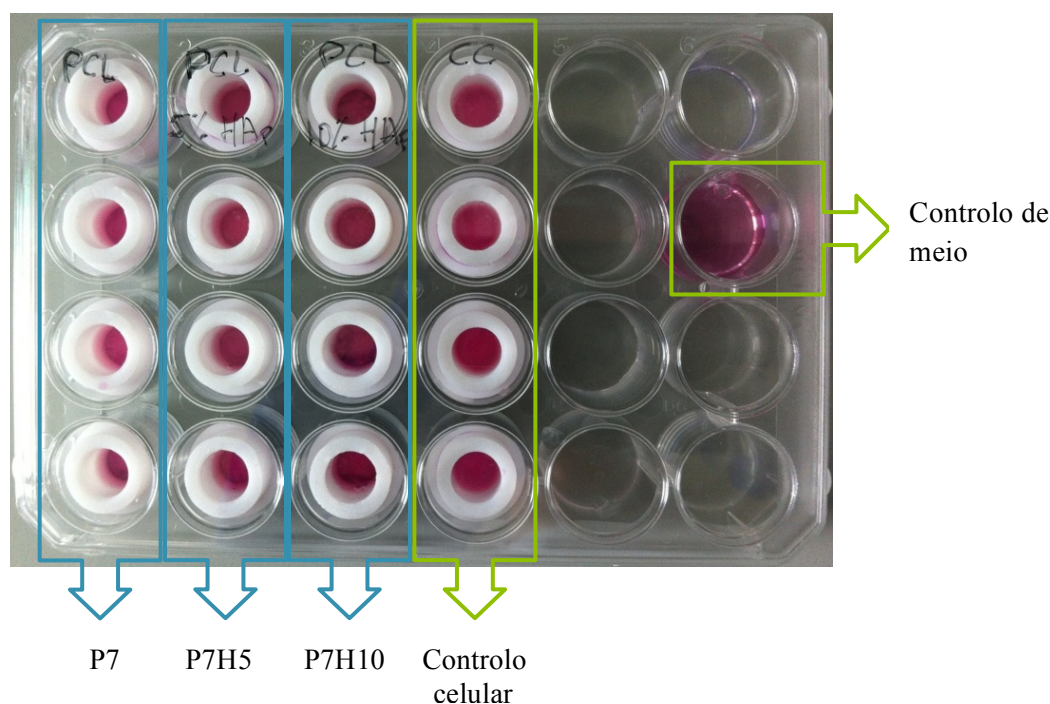


Figura 2.13 – Montagem da placa de 24 poços para cultura celular: a azul, os vários materiais e a verde, os controlos

Todos os procedimentos envolvendo células vivas foram realizados numa câmara de fluxo laminar (ESCO Labculture) de modo a evitar contaminações.

3. Resultados e Discussão

Neste capítulo encontram-se apresentados os resultados obtidos, tanto para as membranas como para as espumas produzidas. Segue-se a análise da condutividade e viscosidade das soluções que lhes deram origem, e também o estudo da porosidade, morfologia e composição química, das membranas e espumas. Adicionalmente, serão averiguados os resultados dos estudos mecânicos realizados às espumas poliméricas e compósitas.

3.1. Condutividade das soluções

A condutividade eléctrica de uma substância descreve a capacidade que os transportadores de carga têm de se movimentar. O resultado das medições da condutividade de cada uma das soluções encontra-se discriminado na tabela seguinte (Tabela 3.1):

Tabela 3.1 – Condutividade das várias soluções usadas

Concentração	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
P1	6,03
P3	2,66
P5	1,69
P7	1,15
P7H5	3,89
P7H10	6,32

Tal como é possível observar, a condutividade diminui com o aumento da concentração de PCL e volta a aumentar com a adição de HAp. A condutividade de uma solução polimérica dependente muito do solvente utilizado [56].

Se se aumentar a concentração, está-se a aumentar a quantidade de polímero, e assim existem mais cadeias poliméricas a oferecer resistência à passagem dos transportadores de carga na solução, provocando a diminuição da sua condutividade. Quando se adiciona HAp à solução, a resistência à passagem dos transportadores de carga é diminuída. Isto deve-se à natureza das ligações iónicas entre os átomos e os grupos funcionais que compõem a HAp (Ca^{2+} , PO_3^{2-} , OH^-), que se encontra dispersa na solução, e que facilitam o movimento dos transportadores de carga (electrões) [73, 74]. Desta forma, com a presença de HAp na solução polimérica, a condutividade da mesma vai aumentar, tal como se pode ver na Tabela 3.1.

Para melhor podermos visualizar as variações na condutividade das soluções, ilustra-se a seguir um gráfico de barras da condutividade em função da concentração (Figura 3.1).

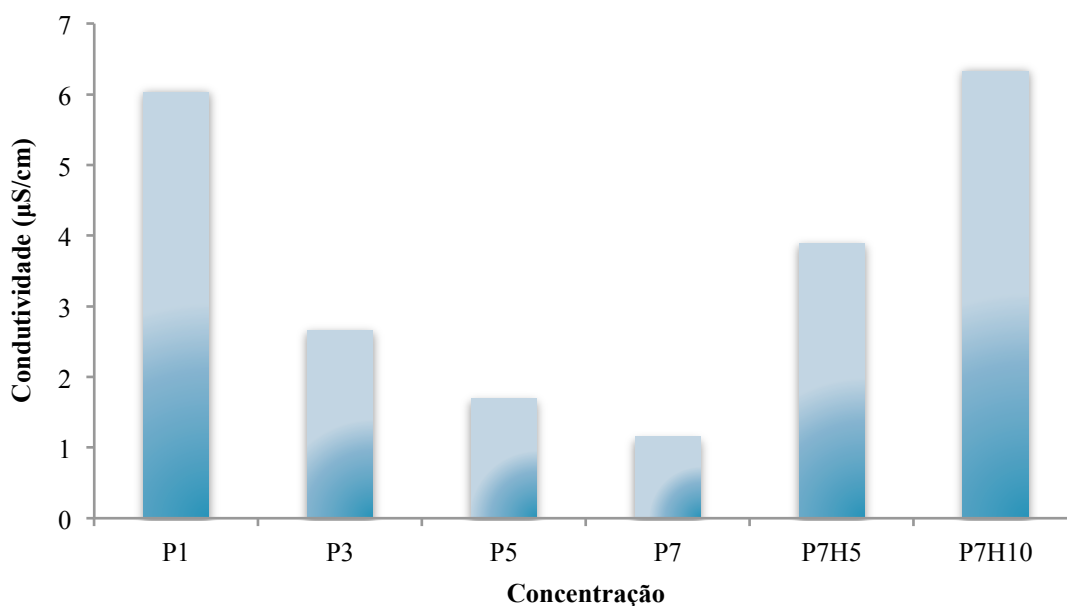


Figura 3.1 – Condutividade das soluções das várias concentrações

Tal como é possível constatar pela Figura 3.1, a condutividade da solução P1 é praticamente a mesma que a P7H10, e a P7H5 a condutividade é cerca de 1,6 vezes menor, mas ainda assim é maior do que a P3. A condutividade mais baixa registada é a P7, pelo que já foi explicado anteriormente.

3.2. Viscosidade das soluções

Na Figura 3.2 encontram-se as curvas de fluxo das várias soluções, em escala logarítmica. Observando o gráfico verifica-se que a viscosidade é maior para maiores concentrações poliméricas e de HAp, tal como era de esperar.

Por outro lado, evidencia-se também que as soluções de P1, P3, P5 e P7 possuem uma viscosidade inferior a $\eta = 1 \text{ Pa.s}$ e apresentam um comportamento típico de um fluido Newtoniano, isto é, a viscosidade mantém-se constante com o aumento da taxa de corte. Já as soluções com HAp, a viscosidade tende a diminuir com a taxa de corte, apresentando uma curva ligeiramente sigmoide, típico de líquidos pseudoplásticos. Podemos notar ainda na Figura 3.2 que a partir de $\dot{\gamma} = 100 \text{ s}^{-1}$, as curvas de viscosidade a P7 e a P7H5 se cruzam e mantêm-se constantes.

De salientar ainda que a solução de P7H10 tem sempre viscosidade acima de $\eta = 1 \text{ Pa.s}$ e a de P7H5 é superior a $\eta = 1 \text{ Pa.s}$ até uma taxa de corte de $\dot{\gamma} = 10 \text{ s}^{-1}$.

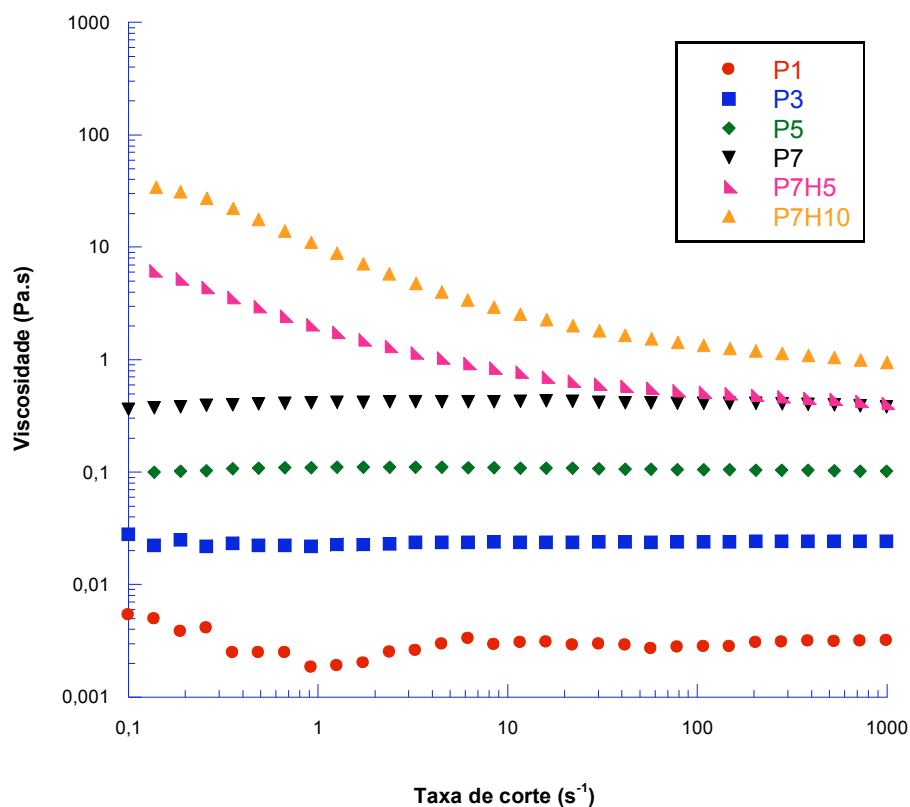


Figura 3.2 – Curvas de fluxo das soluções

3.3. Composição química

A presença de PCL e HAp nas membranas produzidas pode ser comprovada através de FTIR, mediante as vibrações características dos vários grupos funcionais constituintes de cada material. Nos gráficos seguintes encontram-se os espectros FTIR de pós de HAp, de uma membrana constituída apenas por PCL e de uma membrana compósita constituída por PCL e HAp.

Analizando os espectros da membrana de PCL e dos pós de HAp na Figura 3.3 e a Tabela 3.2 constata-se a presença dos picos característicos encontrados na literatura.

Podemos ver a presença das ligações CH_2 do PCL a 2944 e a 2874 cm^{-1} , assim como o grupo carbonilo C=O a 1728 cm^{-1} , o *stretching* dos grupos C-O e C-C a 1288 cm^{-1} , referentes à fase cristalina do PCL e o *stretching* dos grupos COC a 1237 cm^{-1} e do OC-O a 1190 cm^{-1} . Da HAp, podemos destacar a deformação assimétrica do grupo OH^- por volta de 3478 cm^{-1} , uma banda a 2361 cm^{-1} referente à espécie CO_2 , a presença de H_2O a 1629 cm^{-1} , a deformação

simétrica do PO_4^{3-} a 1020 cm^{-1} e assimétrica angular entre os 542 e os 603 cm^{-1} e o grupo CO_3^{2-} a 868 cm^{-1} . A presença do grupo CO_3^{2-} está provavelmente associada à adsorção do CO_2 e à reacção com a água à superfície, formando espécies $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ [75].

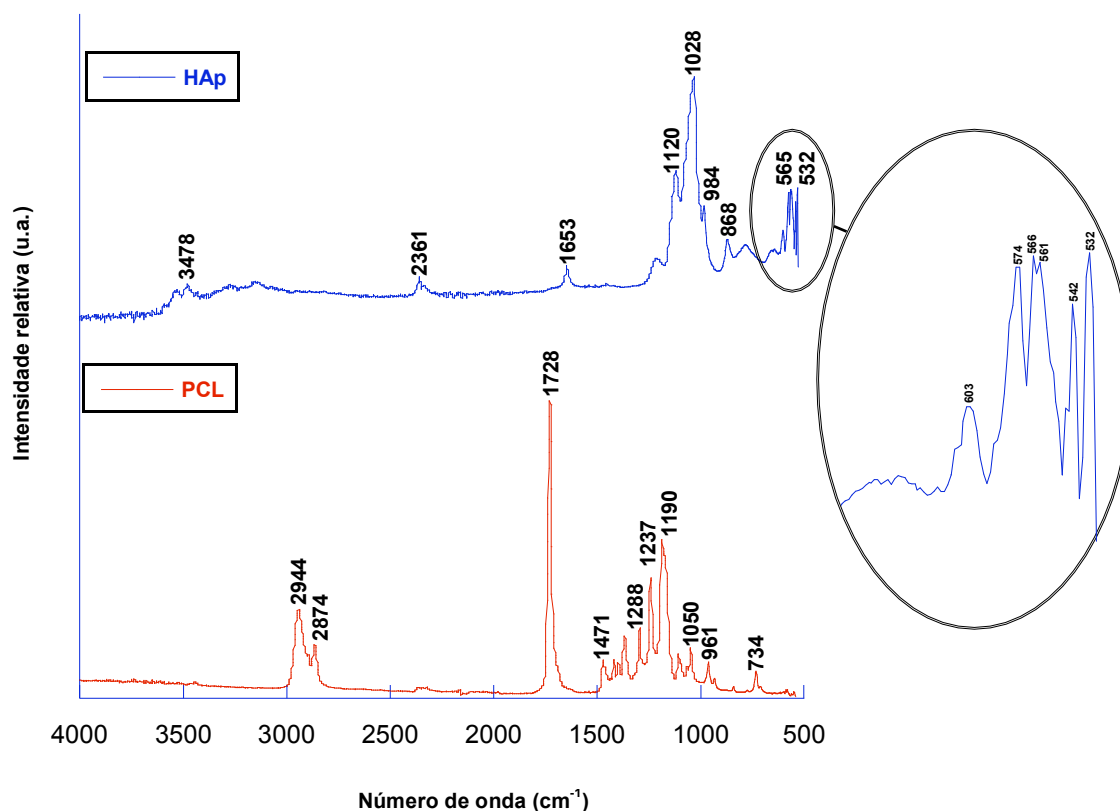


Figura 3.3 – Espectro de absorção FTIR de uma membrana constituída por PCL e de pós de HAp

As bandas de vibração de HAp que não são visualizadas no respectivo espectro poderão estar associados às suas intensidades relativas, que provavelmente serão menores e assim de difícil identificação perante outros de maior intensidade.

Na Figura 3.4 podemos facilmente comprovar a existência de PCL nas membranas compósitas. Já os picos referentes à HAp são mais difíceis de ver pois encontram-se “mascarados” pelos picos do PCL (por surgirem nas mesmas posições). Ainda assim, é visível uma banda por volta dos 2356 cm^{-1} , referente à espécie CO_2 e um pico a 567 cm^{-1} , associado ao grupo PO_4^{3-} da HAp, que apesar de não ser o mais proeminente no espectro da HAp, não está na gama dos números de onda onde o espectro do PCL se expressa.

De referir ainda a zona assinalada no espectro da Figura 3.4, a qual apresenta intensidades relativas ligeiramente diferentes do que se tivéssemos apenas PCL (Figura 3.3) e aparecem na mesma gama de números de onda, o que reforça o facto dos modos vibracionais da HAp estarem “mascarados” pelos do PCL.

Tabela 3.2 – Modos de vibração FTIR identificados na literatura para o PCL e HAp [48, 75-78]

PCL		HAp	
Número de onda (cm ⁻¹)	Grupos funcionais	Números de onda (cm ⁻¹)	Grupos funcionais
2949	<i>Stretching</i> assimétrico de CH ₂	3300-3800	Deformação assimétrica do OH ⁻
2865	<i>Stretching</i> simétrico de CH ₂	3400 e 1629	Presença de H ₂ O
		2332-2354	CO ₂
1727	<i>Stretching</i> do grupo carbonilo (C=O)	880, 1457 e 1550	Grupo CO ₃ ²⁻ resultante da carbonatação da HAp
1293	<i>Stretching</i> do C-O e C-C na fase cristalina	870, 1430 e 1460	
1240	<i>Stretching</i> COC assimétrico	630 e 3570	<i>Stretching</i> de um grupo livre de OH ⁻
1190	<i>Stretching</i> OC-O	1100	Deformação assimétrica do PO ₄ ³⁻
1170	<i>Stretching</i> simétrico do COC	550, 570 e 600	Deformação angular assimétrica do PO ₄ ³⁻
1157	<i>Stretching</i> do C-O e C-C na fase amorfa	450 e 1000	Deformação simétrica do PO ₄ ³⁻

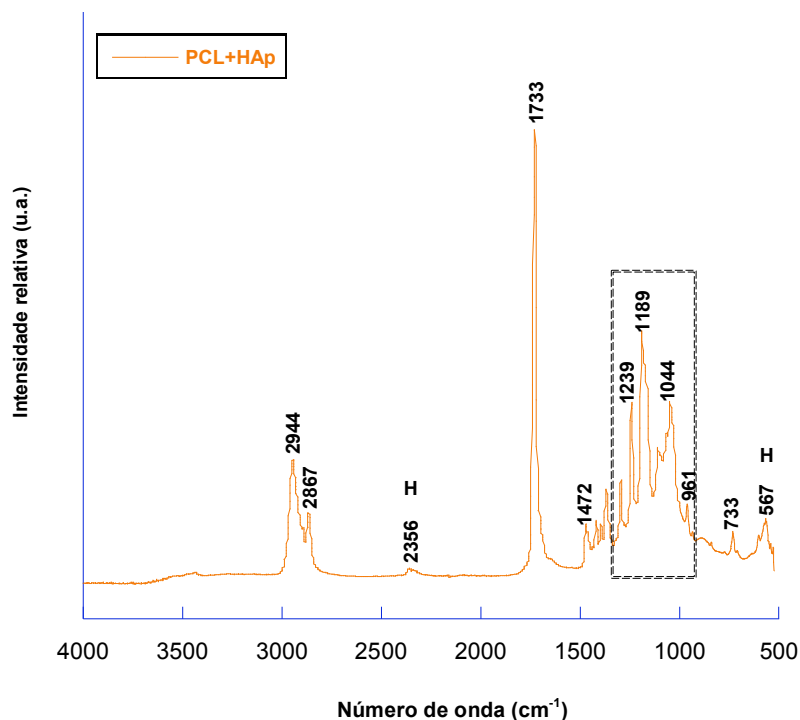


Figura 3.4 – Espectro de absorção FTIR de uma membrana compósita constituída por PCL e HAp, em que os picos assinalados com H correspondem aos da HAp

Podemos, então, concluir que as membranas compósitas possuem efectivamente PCL e HAp na sua constituição.

3.4. Membranas

3.4.1. Análise morfológica

O processo de electrofiação é um processo complexo que envolve diversas variáveis que influenciam muito a morfologia final das fibras. Tendo em conta que o principal objectivo desta fase inicial do trabalho era obter estruturas em forma de favos, começou-se por determinar a concentração mais adequada à obtenção destas estruturas.

Como um dos factores envolvidos na formação dos favos é a presença de fibras em estado húmido [41], utilizaram-se baixas concentrações poliméricas (soluções pouco viscosas), escolhendo-se para o efeito, a solução P7 como ponto de partida. Descoberta a concentração óptima, variaram-se os outros parâmetros, um a um, mantendo constantes os restantes.

Os parâmetros a avaliar são a concentração, a tensão aplicada à agulha, a distância da agulha ao colector, o caudal, a humidade e o tempo de deposição. Posteriormente, fizeram-se variar alguns parâmetros simultaneamente e avaliaram-se as alterações daí decorrentes nas estruturas auto-organizadas. A variação destes parâmetros permitirão adquirir sensibilidade ao processo para o polímero em questão, tanto no tipo de fibras como nos padrões obtidos.

Além do estudo da variação dos parâmetros de electrofiação na formação de favos, testou-se igualmente o efeito da adição de HAp.

As imagens resultantes da observação por SEM ilustram-se nos pontos seguintes.

3.4.1.1. Variação da concentração

No que respeita à morfologia das fibras é possível verificar pela Figura 3.5 que, com a diminuição da concentração polimérica ocorre uma concomitante redução do diâmetro das fibras e o aumento da presença de contas (e mais esféricas), tal como era de esperar pelas razões descritas no capítulo dos Materiais e Métodos (Capítulo 2).

A redução do diâmetro das fibras com a diminuição da concentração pode ser comprovada pela Tabela 3.3, onde se apresentam os valores médios das fibras e o respectivo desvio padrão. Podemos ver, pelo desvio padrão, que existe uma elevada dispersão dos diâmetros medidos, ou seja, existem fibras mais finas do que outras.

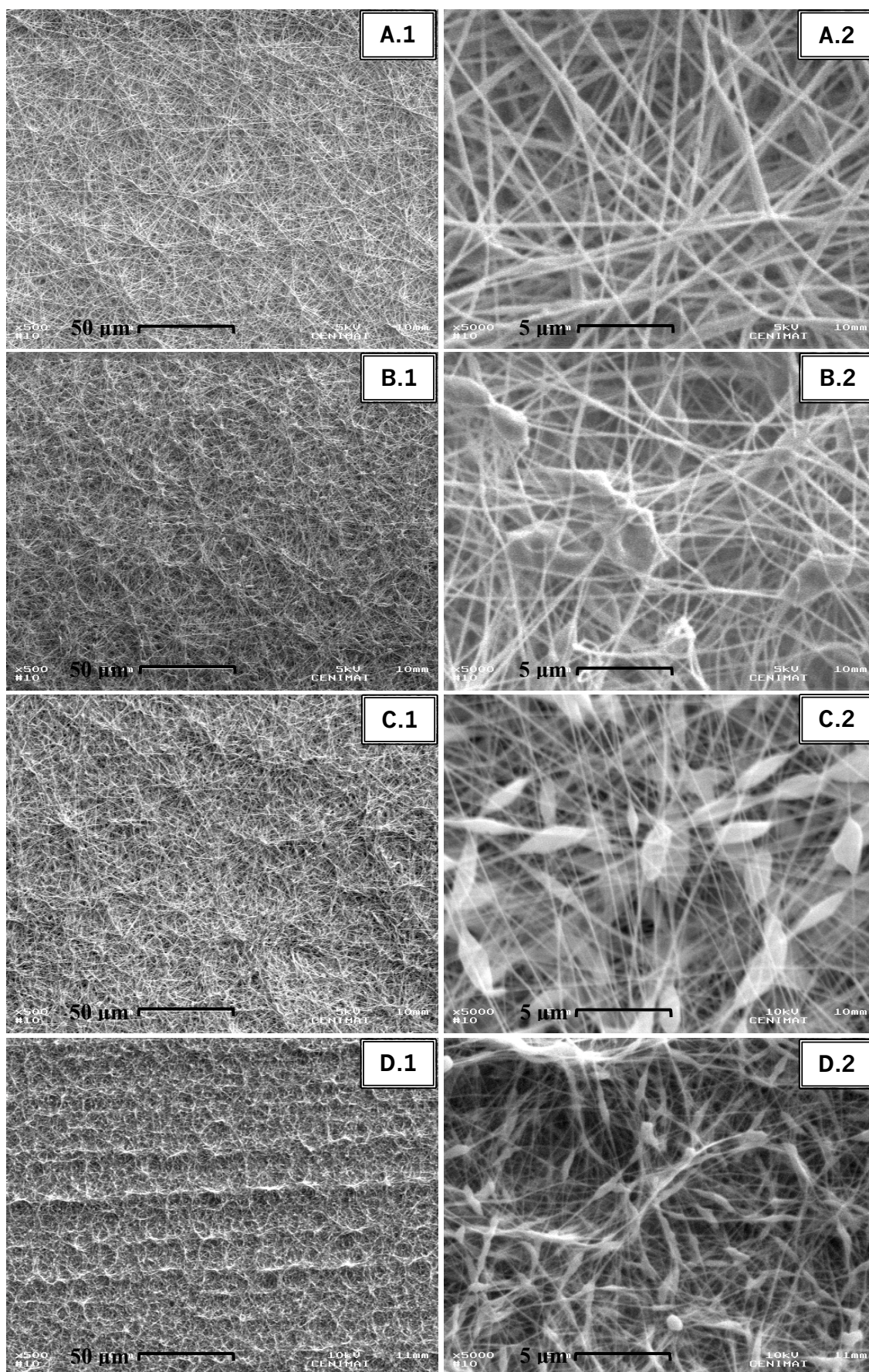


Figura 3.5 – Imagens de SEM de membranas obtidas a (A.1) e (A.2) P7, (B.1) e (B.2) P5, (C.1) e (C.2) P3, e (D.1) e (D.2) P1, com ampliações de x500 e x5000

Quanto à estrutura produzida pelas fibras verifica-se uma tendência crescente para a organização em forma de favos com a diminuição da concentração polimérica, que é bastante notória a P1 (Figura 3.5 (D1)). Este facto leva a concluir que a presença de contas, decorrentes da diminuição da concentração polimérica é importante para a formação dos favos.

Tabela 3.3 – Diâmetro médio das fibras e respectivo desvio padrão, de membranas com diferentes concentrações de PCL

Concentração	Diâmetro das fibras (nm)
P7	214 ± 54
P5	159 ± 40
P3	100 ± 30
P1	100 ± 17

A deposição de fibras no início do processo de electrofiação é aleatória. Quando as fibras chegam ao colector, são neutralizadas electricamente¹ e ficam polarizadas em relação ao presente campo eléctrico – formam-se dipolos induzidos que se alinham na direcção do campo eléctrico (Figura 3.6). Como consequência do fenómeno de polarização, as cargas negativas das fibras deslocam-se para a sua superfície, onde se acumulam, e do lado das fibras que estão em voo – sentido oposto ao campo eléctrico [43, 45].

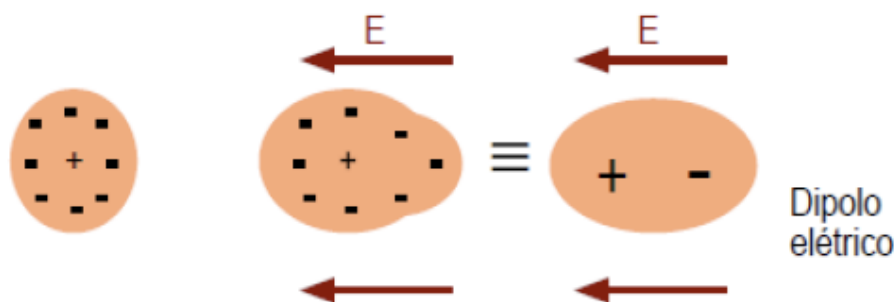


Figura 3.6 – Fenómeno de polarização num material dieléctrico [79]

À medida que a deposição progride começam a surgir irregularidades topográficas – fibras de maiores diâmetros e/ou contas – que criam zonas com maior densidade de fibras do que outras. Estas zonas mais povoadas vão estar mais dotadas para atrair mais fibras:

¹ Devido ao facto das fibras ainda se encontrarem húmidas, vão entrar em bom contacto com o colector, o que

- Por um lado, a acumulação de cargas negativas à superfície das fibras, vai resultar num maior grau de polarização das fibras colectadas e terão sempre uma maior capacidade de distorcer o campo eléctrico circundante [43];
- Por outro, as fibras em voo vão realizar o percurso que lhes permitir atingir mais rapidamente o colector (menor distância), ou seja, nas zonas em que há maior densidade de fibras e contas – efeito pára-raios.

Desta forma, o jacto polimérico depositar-se-á preferencialmente nestas zonas, guiadas pela atracção electrostática, que permitirão a formação das primeiras arestas dos favos [43].

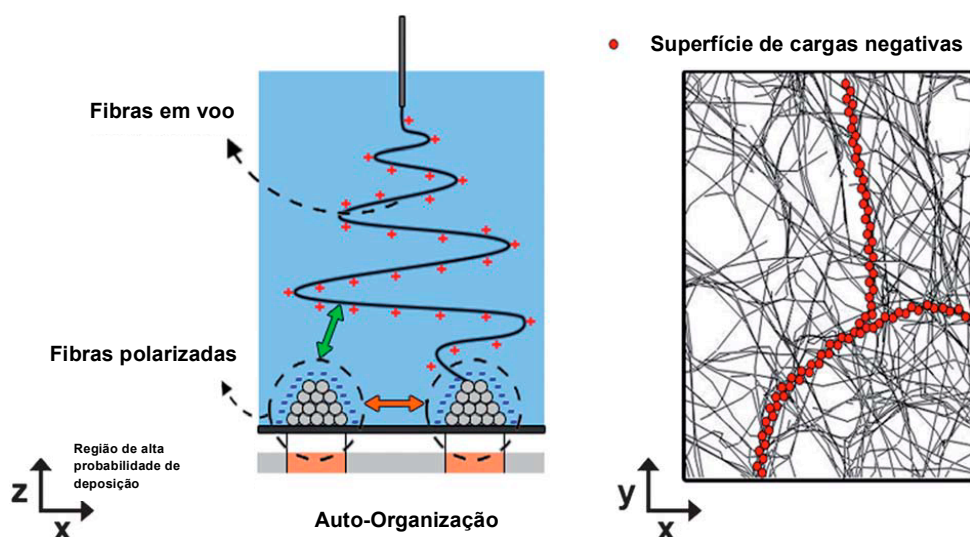


Figura 3.7 – Esquema do balanço entre as forças electrostáticas atrativas (seta verde) e repulsivas (seta cor-de-laranja). Representação da cargas negativas que localizam à superfície (adaptado de [43])

Nos pontos seguintes, segue-se a análise da influência que os restantes parâmetros associados à electrofiação têm, ou não, na estrutura produzida.

3.4.1.2. Variação da tensão

Como concluído anteriormente, a concentração P1 foi a que possibilitou uma melhor formação de estruturas hexagonais. Deste modo, para esta concentração fez-se variar a tensão, para os mesmos 15 cm de distância ao colector, 0,25 mL/h de caudal, agulha com diâmetro interno de 0,2 mm, e as mesmas condições de humidade e temperatura (40-50 % de HR e $\approx 25^{\circ}\text{C}$) – Figura 3.8.

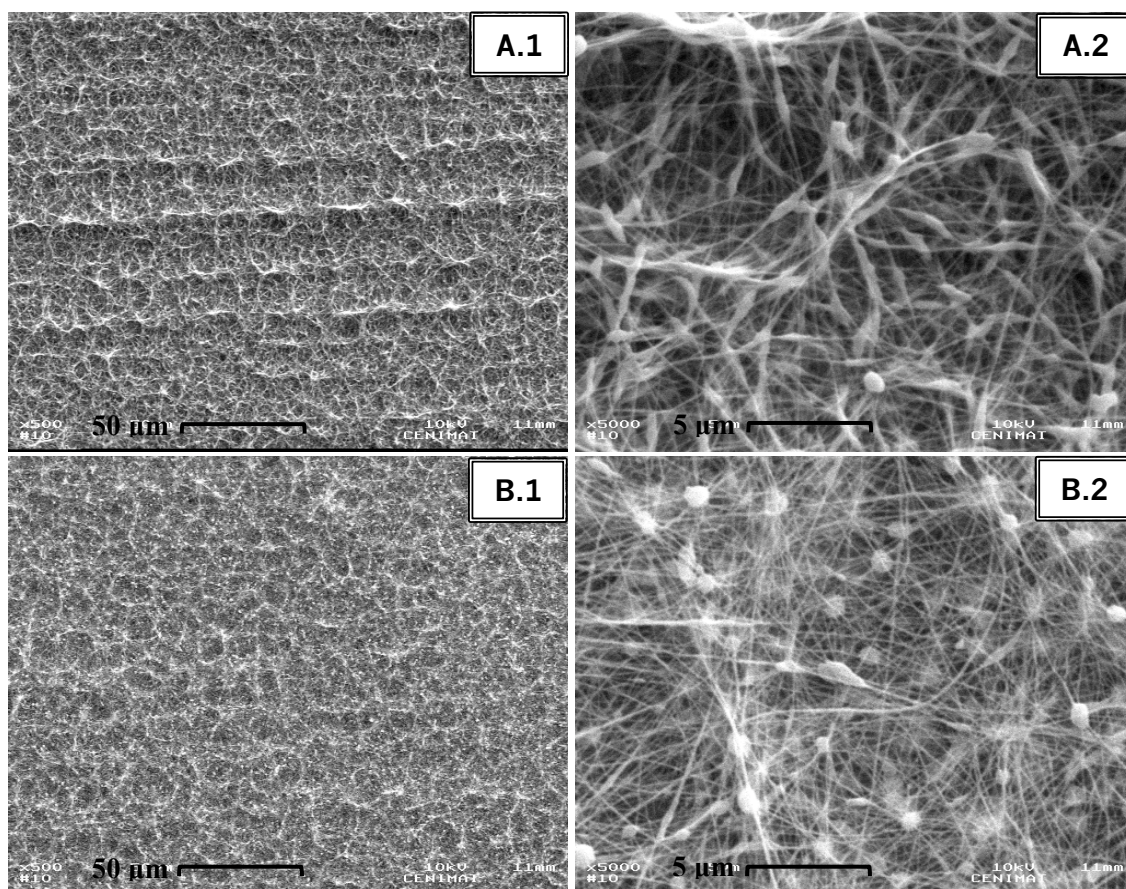


Figura 3.8 – Imagens de SEM de membranas obtidas à escala indicada de soluções P1 a (A.1) e (A.2) 15 kV, e (B.1) e (B.2) 20 kV, com ampliação de x500 e x5000, respectivamente

Em termos da morfologia das fibras sabe-se que o aumento da tensão pode conduzir ao aumento ou à diminuição do diâmetro das mesmas (Tabela 3.4). Neste caso, parece ocorrer a uma ligeira diminuição do diâmetro das fibras, o que leva a crer que a auto-repulsão das cargas presentes no jacto é o efeito dominante. Contudo, as diferenças registadas não são estatisticamente significativas.

Tabela 3.4 – Diâmetro médio das fibras e respectivo desvio padrão, de membranas obtidas a partir de soluções P1, sujeitas a diferentes tensões eléctricas

Tensão (kV)	Diâmetro das fibras (nm)
15	100 ± 17
20	96 ± 21

No que respeita à estrutura obtida, verifica-se que o aumento da tensão tende a conduzir ao aumento do tamanho dos favos, que é visível na Figura 3.8 e na Tabela 3.5. Este resultado pode ser justificado pelo aumento da repulsão electrostática das fibras ainda húmidas,

decorrente do aumento da tensão (e do campo eléctrico) que tende a afastar as fibras no colector [43].

Tabela 3.5 – Diâmetro EC médio dos favos e respectivo desvio padrão, de membranas obtidas a partir de soluções P1, sujeitas a diferentes tensões eléctricas

Tensão (kV)	Diâmetro EC dos favos (μm)
15	18 ± 2
20	21 ± 4

3.4.1.3. Variação da distância da agulha ao colector

Tal como foi dito na secção dos Materiais e Métodos (Capítulo 2), uma menor distância da agulha ao colector contribui para um menor tempo de voo do jacto, e por isso uma menor evaporação do solvente, que poderá resultar no aumento de contas e/ou na fusão de fibras.

Ao observar as imagens da Figura 3.9 pode-se verificar que há uma maior quantidade de contas para uma menor distância ao colector, tal como e seria de esperar, além de parecer existir uma menor densidade de fibras (pois a solução polimérica acumula-se nas contas).

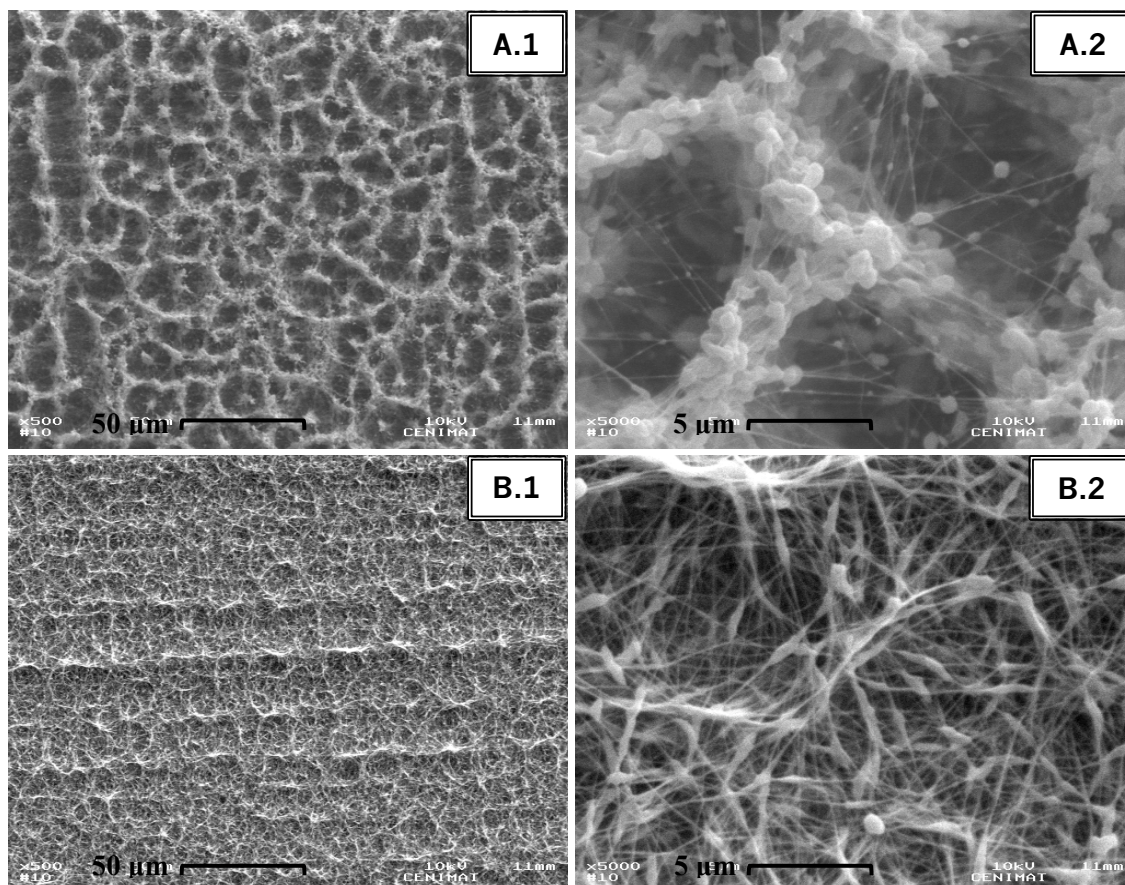


Figura 3.9 – Imagens de SEM de membranas obtidas à escala indicada de soluções P1, com o colector a (A.1) e (A.2) 10 cm, e (B.1) e (B.2) 15 cm, com ampliação de x500 e x5000, respectivamente

No que respeita ao diâmetro das fibras, verifica-se pela tabela seguinte (Tabela 3.6) que os diâmetros são sensivelmente idênticos, a surgirem os maiores diâmetros a uma menor distância.

Tabela 3.6 – Diâmetro médio das fibras e respectivo desvio padrão, de membranas obtidas a partir de soluções P1, com o colector colocado a diferentes distâncias

Distância (cm)	Diâmetro das fibras (nm)
10	102 ± 23
15	100 ± 17

Quanto à dimensão dos favos, observa-se que são maiores a menor distância pois neste caso, a solução polimérica é sujeita a um maior campo eléctrico (15 kV/10 cm=1,5 kV/cm) e por isso, a uma maior repulsão electrostática. Este resultado é semelhante ao obtido anteriormente para o aumento da tensão, porque ambos conduzem ao aumento do campo eléctrico [41, 43].

As paredes das células a 15 cm parecem ser mais fibrosas, pois o jacto polimérico tem um maior tempo de voo e a evaporação do solvente é mais eficaz. De referir que o tempo de voo do jacto é maior, não só por ser um percurso mais extenso a percorrer, mas também por o campo eléctrico ser menor comparativamente ao colector colocado a 10 cm.

Tabela 3.7 – Diâmetro médio EC dos favos e respectivo desvio padrão, de membranas obtidas a partir de soluções P1, com o colector colocado a diferentes distâncias

Distância (cm)	Diâmetro EC dos favos (µm)
10	21 ± 4
15	18 ± 2

3.4.1.4. Variação do caudal

O aumento do caudal conduz geralmente ao aumento do diâmetro das fibras poliméricas, uma vez que a quantidade de solução disponível na agulha para ser estirada é maior.

Observando a Tabela 3.8 verifica-se que os maiores diâmetros das fibras são obtidos a 0,75 mL/h e os menores, a 0,15 mL/h, tal como esperado.

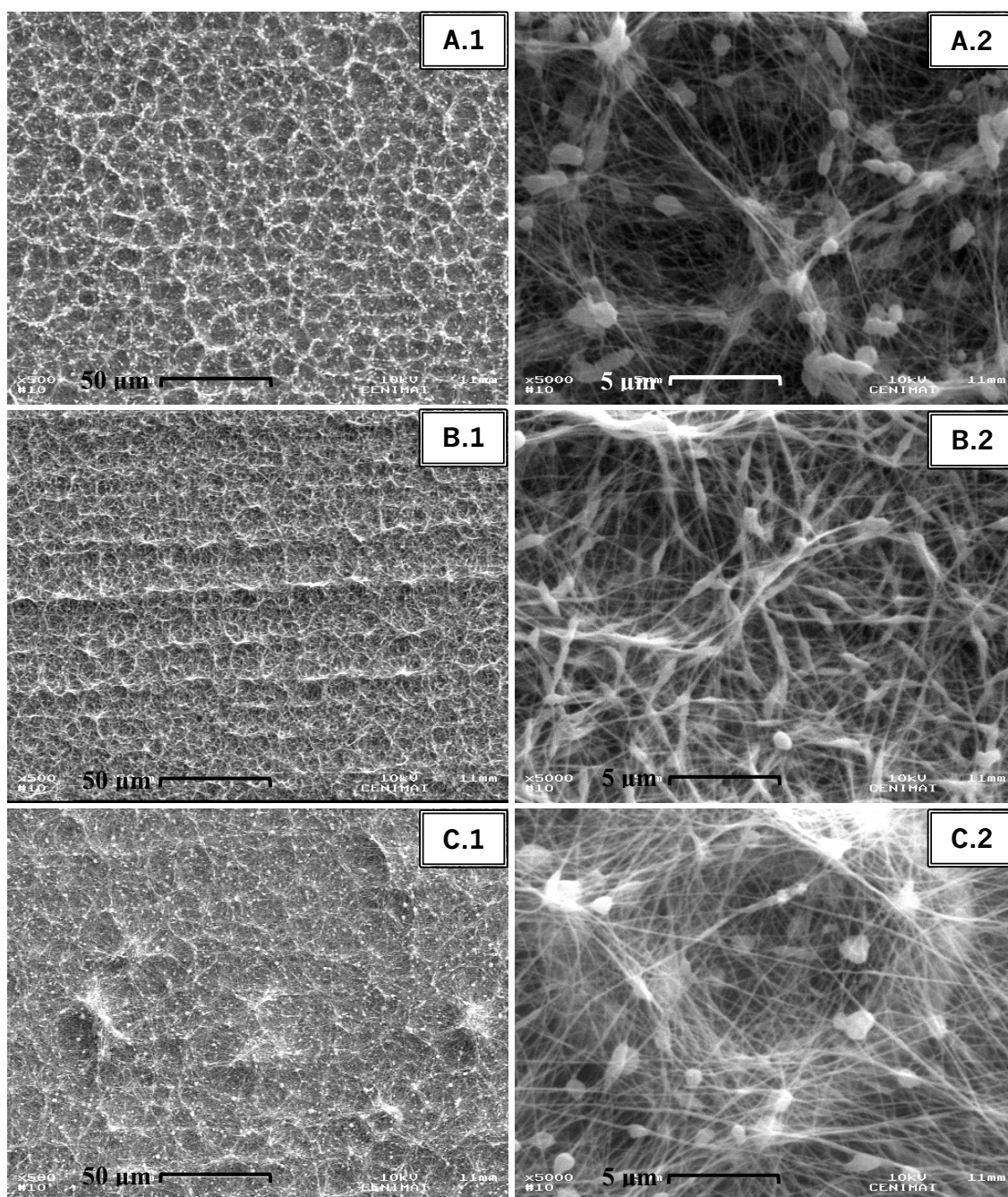


Figura 3.10 – Imagens de SEM de membranas obtidas à escala indicada de soluções P1 com o caudal de (A.1) e (A.2) 0,15 mL/h, (B.1) e (B.2) 0,25 mL/h, e (C.1) e (C.2) 0,75 mL/h, com ampliações de x500 e x5000, respectivamente

Tabela 3.8 – Diâmetro médio das fibras e respectivo desvio padrão, de membranas obtidas a partir de soluções P1 sujeita a diferentes caudais

Caudal (mL/h)	Diâmetro EC dos favos (µm)
0,15	15 ± 2
0,25	18 ± 2
0,75	19 ± 3

No que respeita à estrutura em forma de favos, é preciso ter em conta que quando se aumenta o caudal, está-se a aumentar, não só a quantidade de solvente, mas também a quantidade de polímero disponível na agulha. Além disso, a evaporação do solvente não é tão eficiente, principalmente do DMF. O DMF possui uma constante dielétrica elevada, o que permite obter um maior grau de polarização ($\epsilon_{\text{DMF}}=36,7$) [42, 56].

Desta forma, a maior quantidade de polímero aliado à presença de mais solvente residual, terá uma capacidade superior para atingir elevados graus de polarização, que fará com que a auto-repulsão das fibras aumente e culmine no aparecimento de estruturas de maiores dimensões. Este efeito pode ser observado na Figura 3.10 e comprovado pela Tabela 3.8 [43].

Tabela 3.9 – Diâmetro EC médio dos favos e respectivo desvio padrão, de membranas obtidas a partir de soluções P1 sujeita a diferentes caudais

Caudal (mL/h)	Diâmetro das fibras (nm)
0,15	88 ± 26
0,25	100 ± 17
0,75	131 ± 36

3.4.1.5. Variação do tempo de deposição

A Figura 3.11 mostra a evolução temporal da estrutura, que vai crescendo tridimensionalmente, com os favos a aumentarem de tamanho e as suas paredes a aumentarem de espessura.

As fibras ao chegarem ao colector vão sendo atraídas para zonas mais fortemente polarizadas, formando agregados de elevada espessura [42].

Como os agregados não se encontram igualmente distribuídos, a repulsão electrostática que exercem entre si é diferente, conduzindo à formação de favos maiores ou menores. Favos maiores induzem uma maior componente vertical do campo eléctrico nas paredes dos favos, que resulta numa deposição mais eficiente e no domínio dos padrões maiores sobre os menores. Assim, enquanto a espessura do *scaffold* aumenta, os favos menores vão desaparecendo gradualmente dando lugar a favos de maiores dimensões [42].

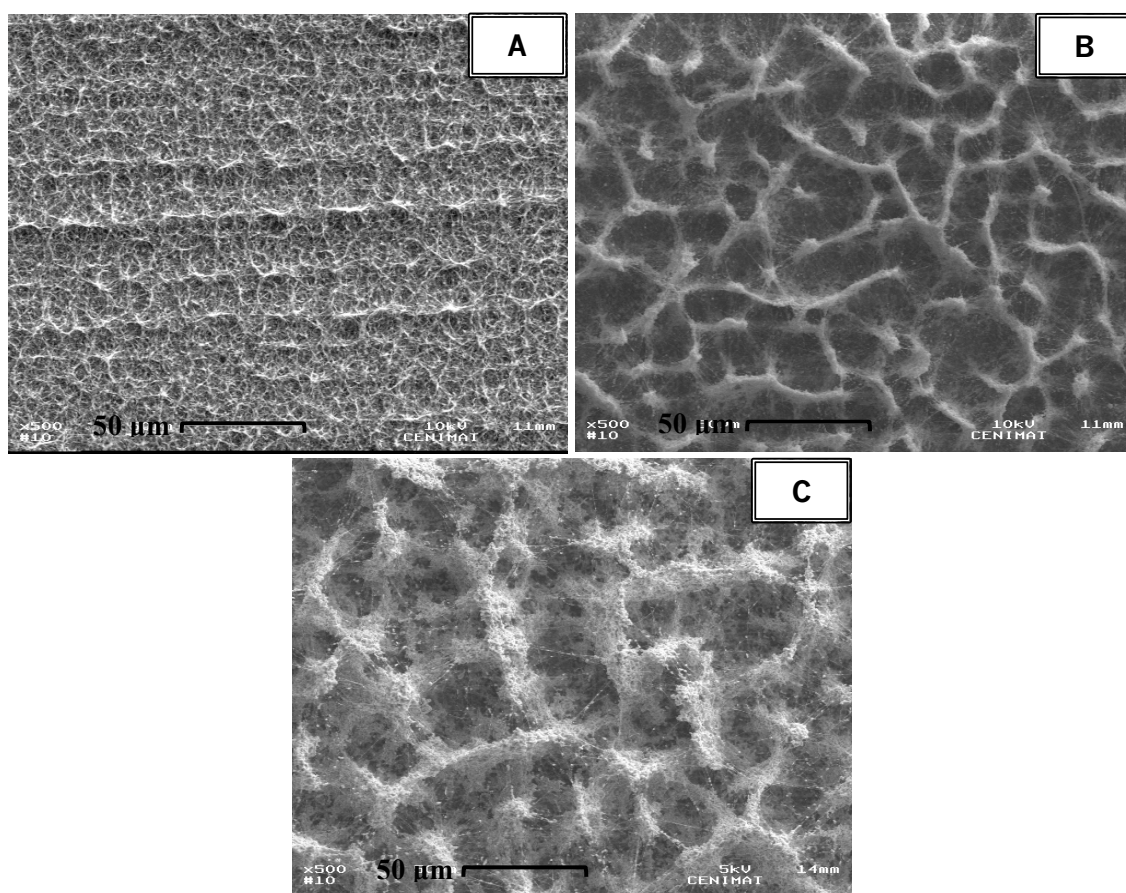


Figura 3.11 – Imagens de SEM de membranas obtidas à escala indicada, de soluções P1, com tempo de deposição de (A) 1 hora, (B) 2 horas e (C) 4 horas, com ampliação de x500

Observa-se pela Tabela 3.10 que a maior variação de tamanho dos favos ocorre de 1 para 2 horas de deposição, e não tanto de 2 para 4 horas.

Tabela 3.10 – Diâmetro EC médio dos favos e respectivo desvio padrão, de membranas obtidas a partir de soluções P1 e com diferentes tempos de deposição

Tempo de deposição (h)	Diâmetro EC dos favos (μm)
1	18 ± 2
2	31 ± 6
4	36 ± 5

3.4.1.6. Variação da humidade

Como discutido no capítulo dos Materiais e Métodos, a humidade, a temperatura e as restantes características atmosféricas são importantes parâmetros que influenciam na morfologia das fibras resultantes. Existe um intervalo de valores para os quais é possível electrofiar, estando dependente também do solvente utilizado.

Pretende-se aqui avaliar o efeito que a humidade relativa (HR) tem na morfologia das fibras e no padrão resultante.

A figura seguinte (Figura 3.12) ilustra o efeito da humidade nos padrões obtidos para 30-40, 40-50 e 50-60 % de HR.

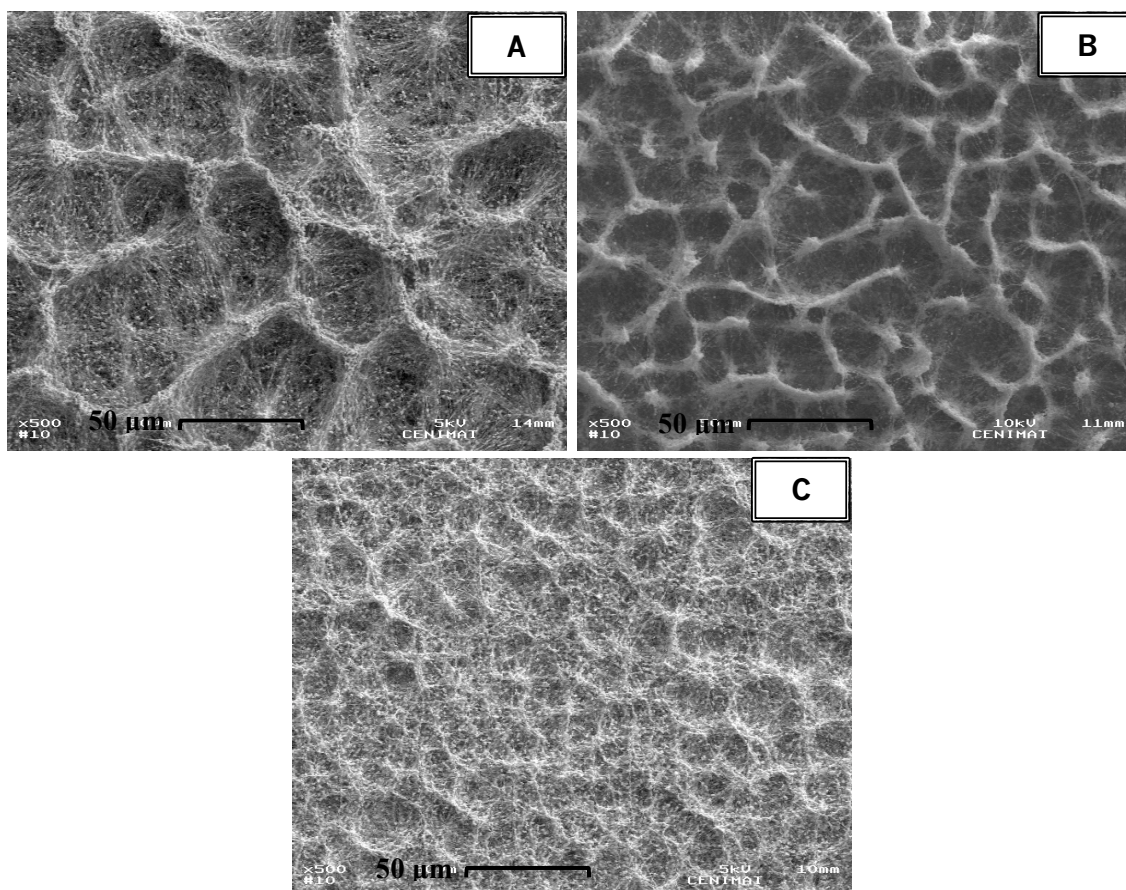


Figura 3.12 – Imagens de SEM de membranas obtidas à escala indicada de 50 μm e ampliação de x5000, de soluções P1, com 2 horas de deposição, para HR entre (A) 30 e 40 %, (B) 40 e 50 % e (C) 50 e 60 %

Comparando as imagens da Figura 3.12 verifica-se que todas apresentam favos, e o seu tamanho tende a ser menor para HR mais elevadas do que para mais baixas, o que significa que a HR poderá ter um papel importante na auto-organização das fibras.

Tabela 3.11 – Diâmetro EC médio dos favos e respectivo desvio padrão, de membranas obtidas a partir de soluções P1, sujeitas a diferentes percentagens de HR

% HR	Diâmetro EC dos favos (μm)
30-40	45 ± 7
40-50	31 ± 6
50-60	15 ± 3

Viu-se anteriormente na descrição do processo de electrofiação (Capítulo 2) que, na presença de uma maior percentagem de HR, a difusão das cargas presentes no ar é facilitada, o que conduzirá a uma redução das cargas transportadas pelo jacto. Com menos cargas no jacto, auto-repulsão é menor e consequentemente leva à redução do tamanho do favo.

3.4.1.7. Variação de mais do que um parâmetro simultaneamente

Nos pontos anteriores estudou-se a influência que cada um dos parâmetros de electrofiação tinham na morfologia das fibras e nos padrões produzidos. Neste ponto, pretende-se ilustrar que variando mais do que um parâmetro simultaneamente, relativamente às condições iniciais citadas (15 kV, 15 cm, 0,25 mL/h, 40-50 % humidade), se obtêm resultados distintos.

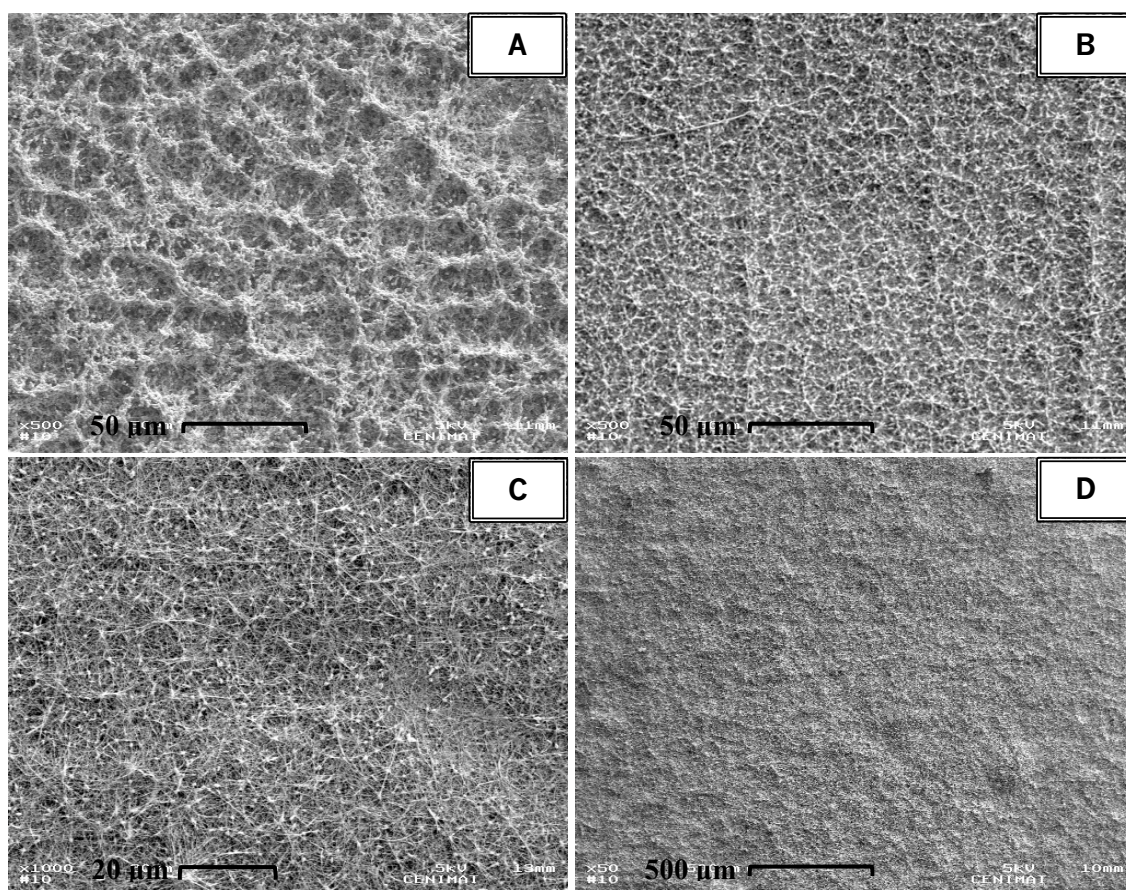


Figura 3.13 – Imagens de SEM de membranas obtidas a (A) P1, 10 kV, 10 cm, 0,25 mL/h e HR entre 40-50 % (ampliação x5000), (B) P1, 20 kV, 20 cm, 0,25 mL/h e HR entre 40-50 % (ampliação x5000), (C) P1, 20 kV, 15 cm, 0,15 mL/h e HR entre 40-50 % (ampliação x1000) e (D) P7, 15 kV, 10 cm, 0,75 mL/h, HR entre 50-60 % e agulha de 0,5 mm de diâmetro interno (ampliação x50)

Anteriormente verificou-se que uma menor tensão conduzia a um menor tamanho dos favos, devido ao menor campo eléctrico (1 kV/cm). No entanto, se mantivermos o mesmo

campo eléctrico de 1 kV/cm, mas em vez de usarmos 15 kV e 15 cm, usarmos 10 kV e 10 cm (Figura 3.13 (A)), obtêm-se favos ligeiramente maiores (diâmetro $EC=25 \pm 5 \mu\text{m}$), pois o tempo de voo é menor e assim há mais solvente residual, o que conduz que a maiores graus de polarização (menor dissipação da polarização). Consequentemente, há uma maior repulsão electrostática entre os agregados de fibras – favos maiores.

Já se a tensão e a distância ao colector forem de 20 kV e 20 cm (Figura 3.13 (B)), respectivamente, os favos são bastante mais pequenos. Isto deve-se ao facto de, mesmo sujeito ao mesmo campo eléctrico, a tensão aplicada ser maior. Assim, há um grande estiramento do jacto e aliado ao facto da distância percorrida ser maior, o processo de evaporação do solvente é mais eficiente. As fibras chegam, então, ao colector com menos quantidade de solvente residual e possuem menos capacidade de serem polarizadas – baixos graus de polarização.

Se baixarmos o caudal para 0,15 mL/h e aumentarmos a tensão para 20 kV (Figura 3.13 (C)), ao contrário do que foi observado para 15 kV (Figura 3.8 (B.1) e (B.2), pág. 42), o padrão tende a perder-se, pois nesta situação temos um menor caudal sujeito a um maior campo eléctrico (1 kV/cm) – fibras fracamente polarizadas.

Como a P7 não se tinham obtido favos, concluiu-se que as fibras não estariam suficientemente húmidas ou polarizadas, testou-se a variação de parâmetros que invertesse essa situação: aumentar o caudal, diminuir a distância do colector e a humidade relativa (Figura 3.13 (D)). Contudo, apenas se visualizam umas ligeiras irregularidades na topografia das membranas, pelo que as alterações realizadas não foram suficientes para a formação de agregados húmidos e adequadamente polarizados.

3.4.1.8. Adição de HAp

Verificou-se anteriormente que uma combinação adequada de todos os parâmetros de electrofiação podem mudar substancialmente os resultados. Assim, mediante o conhecimento que foi adquirido, testou-se o efeito que a adição da HAp teria nas estruturas, avaliando se seria possível ou não, a formação dos favos. Os parâmetros usados foram de 15 kV de tensão, 10 cm de distância ao colector, agulha de 0,5 mm de diâmetro interno, caudal de 0,75 mL/h e percentagem de HR entre 50-60 %.

A Figura 3.14 ilustra as imagens de SEM de membranas P7H5 e P7H10 produzidas sob as condições descritas acima. Como é possível visualizar, ocorreu a formação de favos, o que nos permite concluir que a HAp aqui possui também um papel fundamental neste processo.

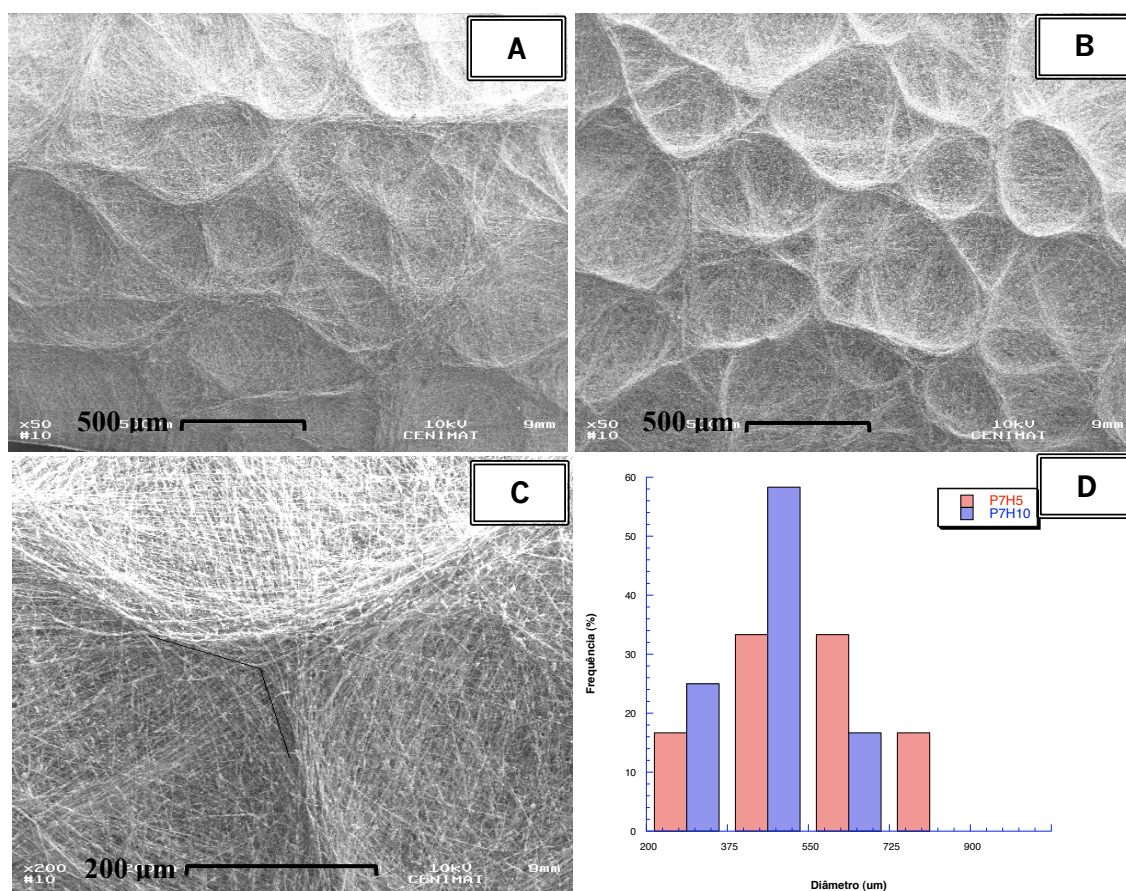


Figura 3.14 – Imagens de SEM de uma membrana obtida a (A) P7H5 e a (B) P7H10, com ampliação de x50. (C) Imagem de SEM do ângulo de 120° formado na estrutura, com ampliação de x200. (D) Respetivo histograma do diâmetro EC dos favos

Na secção 3.4.1.7. pudemos ver que à concentração P7, mediante os mesmos parâmetros de produção, não houve uma formação evidente de favos. Partindo do pressuposto que não ocorreram quaisquer variações durante o processo, ir-se-á avaliar as diferenças que existem na solução quando se adiciona HAp, tais como a condutividade e a viscosidade.

Pelas imagens da Figura 3.15 podemos ver a presença de aglomerados de HAp que indicam que, mesmo tendo sido a solução sonicada previamente, a HAp não foi bem dispersa. Além disso, tratando-se de HAp nano, a tendência em agregar-se é ainda maior e aumenta com a quantidade da mesma.

Existe também uma grande dispersão no diâmetro das fibras, variando entre 200 e 1000 nm, onde as mais finas correspondem àquelas onde não se vêem os agregados de HAp e as mais espessas àquelas onde é claramente evidente a presença dos mesmos. Isto acontece pois a HAp tende a arrastar solução, fazendo com que a sua quantidade seja menor em zonas onde há menos HAp. Estas zonas com menos HAp serão sujeitas a um maior estiramento, o que faz com que surjam fibras muito mais finas [30]. Isso pode ser visualizado nas imagens de SEM, onde as

fibras têm maiores diâmetros nas paredes dos favos e as fibras suspensas em torno dos mesmos são significativamente mais finas. Além disso, observa-se a presença de bastantes contas, onde a HAp se tende a aglomerar.

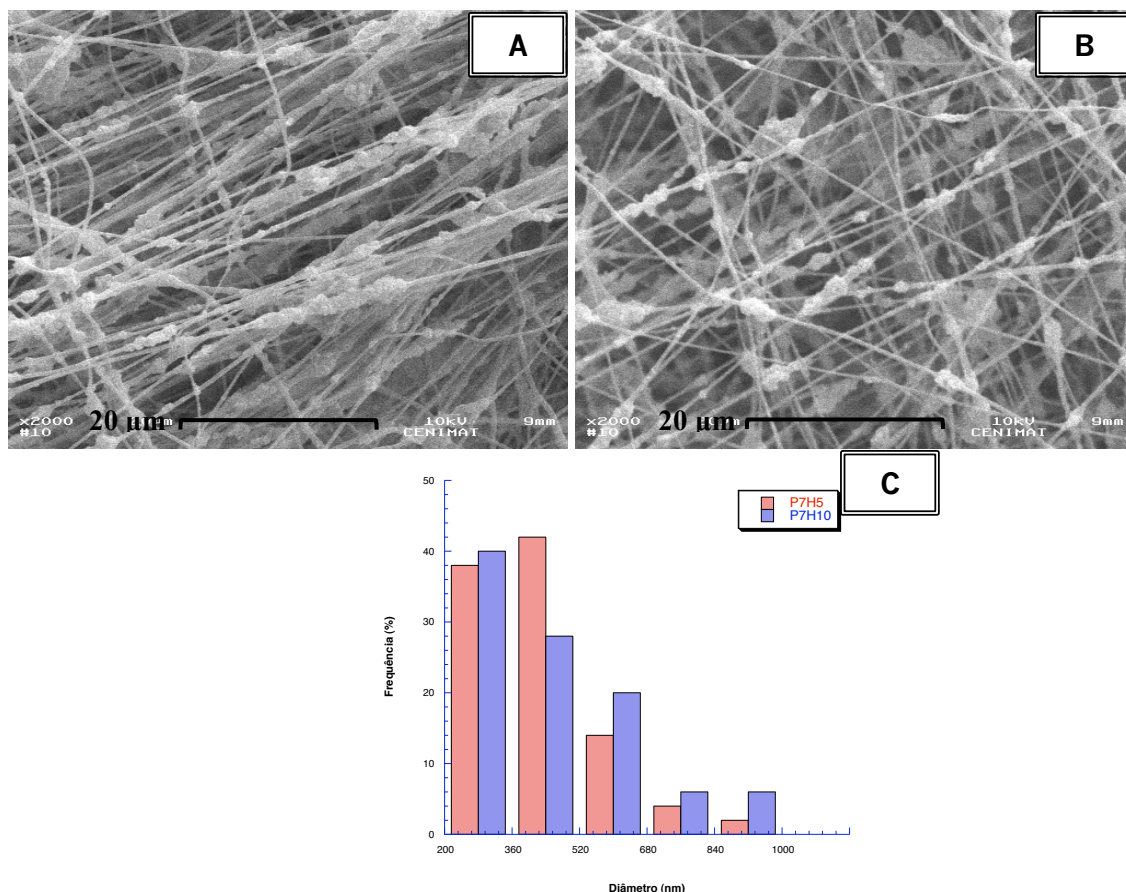


Figura 3.15 – Imagens de SEM ilustrativas da organização das fibras P7HX (em que X é a fração de HAp) (A) nas paredes constituintes dos favos e (B) das fibras suspensas nos padrões, com ampliação de x2000. (D) Respeetivo histograma do diâmetro das fibras

No ponto 3.1 viu-se que a adição da HAp fazia aumentar a condutividade da solução. Tratando-se de uma solução mais condutora, as cargas no jacto são mais facilmente dissipadas e o grau de polarização destas fibras é maior.

É particularmente interessante ver que a condutividade destas soluções com HAp é superior à das soluções P3, P5 e P7, onde não se obtiveram favos e sujeitas aos mesmos parâmetros de electrofiação². Além disso, a HAp não só aumenta a condutividade das soluções, como faz aumentar a viscosidade.

No entanto, a maior viscosidade pode dificultar a evaporação do solvente, na medida em que a HAp arrasta solução e a razão área superficial/volume exposta é menor. A presença de

² As soluções P3 e P5 foram também testadas a 15 kV, 10 cm, 0,75 mL/h e HR entre 50-60 % e não houve formação de favos

solvente residual nas fibras maiores conduz a uma polarização mais eficiente. Existe portanto, um forte compromisso entre a condutividade e a viscosidade da solução.

Quanto à sua geometria, os favos nestas condições são maiores (em média) do que nos casos estudados, pois a maiores concentrações, mais polímero é polarizado, aumentando a sua capacidade para adquirir elevados graus de polarização e consequente repulsão dos agregados [43]. A HAp tende a acentuar este efeito devido à sua condutividade.

Outro aspecto a ressaltar é a presença de uma maior diferença dos diâmetros das fibras, visível nas imagens de SEM, o que leva a concluir que a distribuição bimodal dos diâmetros das fibras na formação de favos, referida por Ahirwal *et al.* [42], tem mais impacto a maiores concentrações (não esquecendo o efeito da HAp). Aqui, os diâmetros maiores possuem mais polímero e HAp, que são os responsáveis pela maior polarização e a formação de agregados.

3.4.1.9. Conclusões

O processo de auto-organização de fibras em forma de favos não está ainda muito claro na literatura e ainda é relativamente recente. Contudo, foi possível tirar algumas conclusões acerca da influência que os parâmetros de electrofiação têm na morfologia dos favos e das fibras. A tabela seguinte (Tabela 3.12) resume os resultados obtidos.

Tabela 3.12 – Influência dos parâmetros de electrofiação no diâmetro das fibras e dos favos

	Maior concentração	Maior tensão	Maior distância	Maior caudal	Maior tempo de deposição	Maior percentagem de HR
Diâmetro das fibras	Aumenta	Diminui	Diminui	Aumenta	—	—
Diâmetro dos favos	Aumenta	Aumenta	Diminui	Aumenta	Aumenta	Diminui

Concluiu-se também que a auto-organização das fibras é muito dependente de factores como a baixa concentração polimérica das soluções e da natureza do solvente, mas também depende muito da combinação dos vários parâmetros de electrofiação. Assim, se pretendermos obter favos com soluções mais viscosas podemos variar simultaneamente mais do que um parâmetro, tais como, aumentar o caudal e o calibre da agulha, diminuir a distância ao colector e elevar a percentagem de HR. Todos estes factores irão contribuir para uma evaporação mais lenta do solvente, permitindo um bom contacto inicial das fibras com o colector e facilitar a sua polarização.

O solvente utilizado é um factor extremamente importante neste fenómeno. Se o solvente tiver uma temperatura de ebulição relativamente baixa, este irá evaporar com relativa facilidade, fazendo desaparecer as fibras e/ou contas húmidas. Pelo contrário, se o solvente usado tiver uma temperatura de ebulição mais elevada, será mais provável o aparecimento das referidas fibras e/ou contas que aumentam a sua polarização, e consequentemente permitem o surgimento das estruturas auto-organizadas.

Além da temperatura de ebulição, há que salientar outras características do solvente, tais como a condutividade, constante dielétrica ($\epsilon_{\text{DCM}}=9,1$ $\epsilon_{\text{DMF}}=36,7$) e o momento dipolar ($p_{\text{DCM}}=1,6$ D e $p_{\text{DMF}}=3,8$ D) [56].

No estudo desenvolvido por Ahirwal *et al* [42], o solvente utilizado era também diclorometano (DCM) e dimetilformamida (DMF), mas numa proporção de 1:1. As estruturas auto-organizadas foram obtidas a concentrações mais elevadas (13 % m/m PCL) do que neste trabalho, atribuindo-se este facto à maior quantidade de DMF utilizada. O DMF possui uma temperatura de ebulição e constante dielétrica mais elevadas do que o DCM, pelo que as fibras chegam ao colector ainda húmidas e por outro lado, estarão mais polarizadas.

A adição da HAp também mostrou ter alguma influência na auto-organização das fibras, verificando-se que, mediante as mesmas condições de produção, obtiveram-se favos com HAp e sem a mesma, não. Isto mostra que não só a presença de uma solução pouco viscosa é preponderante na auto-organização das fibras, mas também um conjunto de factores que se contra-balançam. Além disso, com a adição da HAp assistimos a um aumento da viscosidade, que não impede, de todo, a formação dos favos.

Em suma, é necessário ter uma grande sensibilidade a todo o processo de electrofiação e aos parâmetros envolvidos neste, de modo a resultarem num aumento da formação de agregados com elevado grau de polarização.

3.4.2. Avaliação da bioactividade

O resultado dos ensaios de bioactividade das membranas com HAp, encontram-se a seguir apresentadas na Figura 3.16.

É possível verificar que ocorreu a formação de cristais apatíticos sobre as fibras devido à presença de HAp, que funciona como semente para a nucleação e formação destes cristais [30]. Estas imagens comprovam a bioactividade das membranas compósitas, que é muito importante para a dentina e o osso.

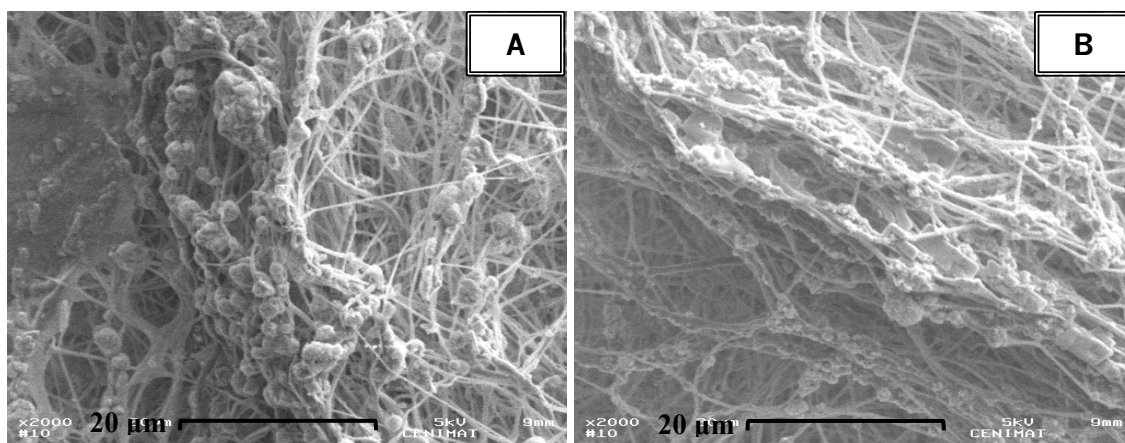


Figura 3.16 – Imagens de SEM ilustrativas da bioactividade das membranas compósitas a (A) P7H5 e a (B) P7H10, com ampliação x2000. As membranas foram imersas numa solução salina de SBF por 6 dias

3.5. Espumas

Para a produção das espumas, utilizou-se a concentração P7 pois a P1 era demasiado baixa para o preenchimento eficiente das depressões do colector, em tempo útil. A essa concentração polimérica foi adicionada HAp, a 5 e a 10 % m/V (P7H5 e P7H10), de modo a avaliar as alterações subsequentes, tanto morfológicas como mecânicas. Estas concentrações permitem ainda a auto-organização das fibras em forma de favos, tal como se verificou anteriormente.

Devido à presença do material dieléctrico (teflon), foi necessário aumentar a tensão de modo a obter um campo eléctrico de 2 kV/cm. Para tal, utilizou-se uma distância da agulha ao colector de 11 cm e uma tensão aplicada de 22,5 kV. O caudal utilizado foi de 0,75 mL/h, por forma a obter um preenchimento do colector num período de tempo menor (5 horas), com as condições de humidade e temperatura controladas entre 50-60 % e 25 °C.

3.5.1. Análise morfológica

O mecanismo de preenchimento das depressões por parte das fibras durante o processo de electrofiação, segue o que foi descrito por Lavielle *et al.* [40]. A presença de um material isolante com fundo condutor, permite que as depressões sejam eficientemente preenchidas, pois as fibras tendem a dirigir-se para zonas condutoras, onde possam dissipar as cargas que transportam. Além disso, devido ao DMF residual, que possui uma constante dieléctrica ($\epsilon_r=36,7$) bem mais elevada do que o teflon ($\epsilon_r=2,1$), o campo eléctrico sobre as fibras já depositadas é muito maior do que sobre o teflon, razão pela qual não se vê grande deposição de fibras sobre o material dieléctrico [42, 80].

Na imagem seguinte (Figura 3.17) é possível ver que, durante uma deposição por electrofiação, a intensidade da componente vertical E_z é bastante superior à componente horizontal, efeito bastante pronunciado nas paredes das depressões. O preenchimento das depressões também está dependente da razão entre o diâmetro e a altura do colector (D/H), sendo menos eficiente quanto menor for esta razão [40].

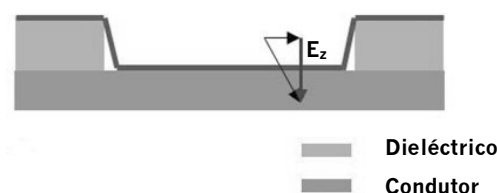


Figura 3.17 – Esquema de deposição de fibras num colector de depressões, feito com dois materiais (adaptado [40])

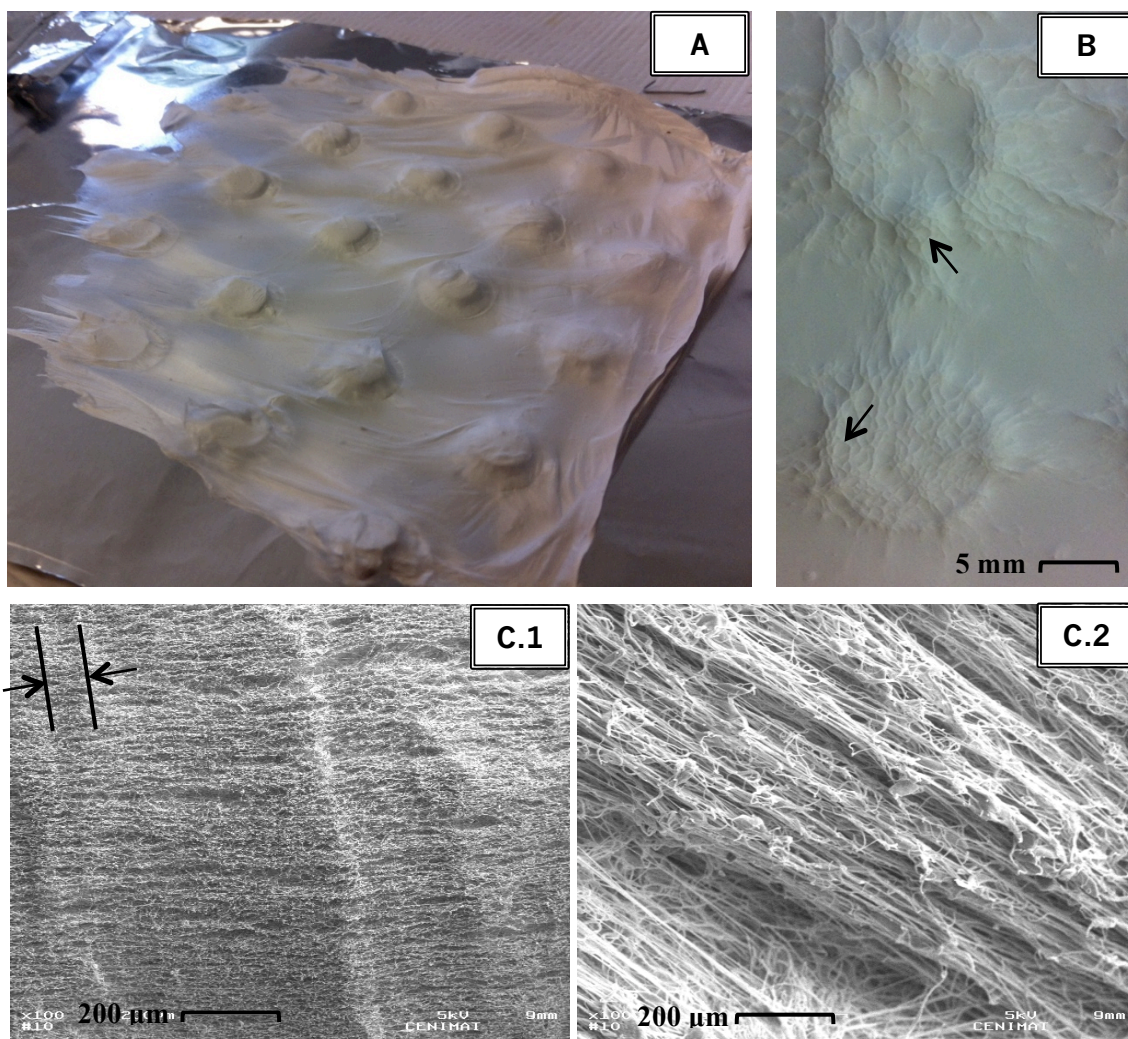


Figura 3.18 – Imagens de espumas produzidas no colector de depressões (A) vistas a partir do fundo do colector e (B) vistas de cima. (C.1) e (C.2) Imagens de SEM de um corte axial de uma espuma, com ampliações de x100 e x1000, respectivamente. As setas em (B) e em (C.1) apontam para formações em favos

À medida que o colector vai sendo preenchido, camadas de favos vão sendo sucessivamente empilhadas, formando uma estrutura estratificada, evidenciada na Figura 3.18 (C.1) e (C.2).

Como a dimensão dos favos aumenta com o tempo de deposição, estes tornam-se maiores com o aumento da espessura do *scaffold* e a porosidade também aumenta [42]. A existência dos favos em cada camada pode igualmente ser comprovada pela Figura 3.18 (B) e (C.1).

3.5.2. Porosidade

A presença de uma boa porosidade com poros interconectados permite que as células no tecido se possam infiltrar na estrutura e construir novo tecido. Também a formação de vasos sanguíneos é crucial no processo de regeneração para alimentar as células, e por isso é preciso a existência dos referidos poros interconectados. Assim, as espumas poderão fazer a ponte no tecido danificado, acelerando o processo regenerativo.

Tal como referido no ponto 2.3.3., a porosidade das espumas pode ser determinada pela expressão (2.3) da pág. 25. A densidade da HAp foi também calculada experimentalmente, tendo-se obtido o valor de $2,48 \text{ g/cm}^3$. Efectuando os respectivos cálculos para quatro amostras, obteve-se o seguinte resultado:

Tabela 3.13 – Porosidade de quatro amostras para os três tipos de material

Porosidade		
P7	P7H5	P7H10
94 ± 1	94 ± 1	94 ± 1

Observando a tabela (Tabela 3.13) vemos que as espumas possuem uma elevada porosidade, rondando os 94 %, valor esse semelhante à porosidade encontrada no osso trabecular (50-90 %). Este aspecto é de especial relevância pois as espumas destinam-se essencialmente à aplicação no tecido ósseo trabecular, sendo de todo o interesse que as propriedades morfológicas do tecido sejam mimetizadas.

3.5.3. Ensaio de compressão

O gráfico seguinte (Figura 3.19) ilustra curvas de compressão das espumas, constituídas por P7, P7H5 e P7H10, em que é possível constatar que se tratam de curvas típicas de compressão de uma espuma, distinguindo-se as três zonas anteriormente mencionadas: (i) a

zona elástica, para uma deformação aproximadamente entre 0 e 0,2; (ii) o patamar de colapso, para deformações sensivelmente entre 0,2 e 0,7; (iii) e a zona de densificação, que tem o seu início a partir de uma deformação de 0,7 e se estende até à deformação máxima. É de salientar ainda que a deformação máxima ($\epsilon=1$) nunca é atingida, o que se deve ao facto de haver uma espessura residual da espuma que não pode ser mais comprimida. Por outro lado, uma deformação elástica de 0,2 significa que cerca de 20 % da estrutura inicial da espuma é recuperada.

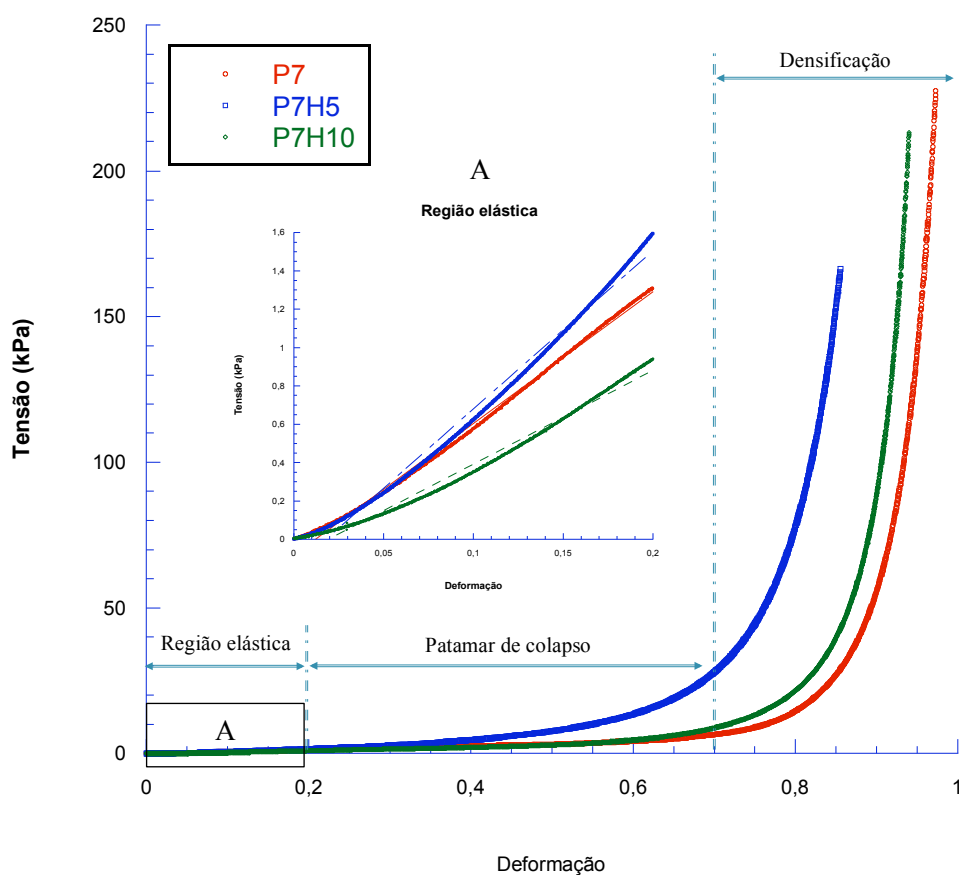


Figura 3.19 – Curvas de compressão típicas de espumas constituídas por P7, P7H5 e P7H10, Indicação das zonas elástica, patamar de colapso e densificação. Apresenta-se também a ampliação da região linear, A, com as respectivas regressões lineares

Para avaliar quantitativamente as propriedades mecânicas das espumas, fez-se uma ampliação da parte inicial do gráfico (zona assinalada com A) e traçou-se a linha de tendência de cada uma das curvas, de modo a determinar o módulo de Young das mesmas, a partir do seu declive. A Tabela 3.14 resume os valores obtidos do módulo de Young médio das espumas e da deformação máxima de compressão.

Tabela 3.14 – Valores do módulo de Young, da deformação máxima de compressão para as respectivas concentrações (P7, P7H5 e P7H10)

Material	E (kPa)	ϵ_m
P7	6 ± 3	$0,97 \pm 0,02$
P7H5	11 ± 2	$0,87 \pm 0,04$
P7H10	6 ± 3	$0,92 \pm 0,04$

Observando a tabela, verificamos que as espumas que possuem aparentemente maior módulo de Young corresponde à P7H5, sendo maior do que o das espumas sem HAp (P7), o que seria de esperar uma vez que a presença da HAp conduz a um do módulo de Young.

No entanto, a P7H10 o módulo de Young é menor do que os restantes, que pode ser justificado pelo facto da nanoHAp ter tendência a aglomerar-se ainda mais com o aumento da concentração e arrastar a solução polimérica, tal como analisado antes. Assim, surgirão zonas em que haverá uma grande quantidade de HAp, ou pelo contrário, pouca quantidade HAp. Esta heterogeneidade da HAp nas fibras poliméricas das espumas irá conduzir, desta forma, a desigualdades nas propriedades mecânicas e consequentemente, o módulo de Young irá diminuir. O facto da deformação máxima de compressão mais baixa ser a P7H5 está igualmente relacionada com o grau de dispersão da HAp.

Apesar das diferenças registadas, é de salientar que o desvio padrão associado a cada material é relativamente elevado, o que ilustra uma elevada amplitude dos valores do módulo de Young das amostras.

Além disso, em todos materiais, o número de amostras testado é baixo e por isso não se pode afirmar com grande fiabilidade que as espumas a P7H10 possuem módulo de Young inferior às espumas P7H5. Seria necessário aumentar a dimensão da amostra (pelo menos 10 amostras) para se obterem valores minimamente aceitáveis.

3.5.4. Testes de adesão e de citotoxicidade

Decorridas 24 horas sobre a sementeira das células Saos-2 nas várias amostras foi possível avaliar a percentagem de células que aderiu ao material. Esta análise é particularmente importante pois a adesão celular é fundamental para que o material possa promover o processo regenerativo dos tecidos.

Os resultados obtidos para a adesão celular a cada tipo de material encontram-se representados no gráfico da Figura 3.20. Os dados utilizados correspondem a uma média dos

valores medidos nas quatro amostras de cada material em relação ao valor médio do controlo, ou seja:

$$P_{ij} (\%) = \frac{P_{m_{ij}}}{C_{m_{ij}}} \times 100 \% \quad (3.1)$$

em que $P_{m_{ij}}$ é a média das populações medidas nas quatro amostras do material i no dia $j=1$ e $C_{m_{ij}}$ é a média das populações medidas nos quatro poços de controlo, no dia $j=1$.

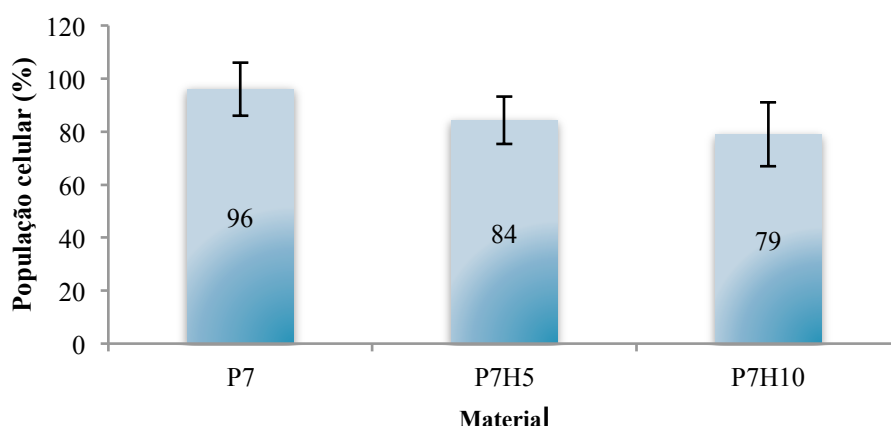


Figura 3.20 – População celular no primeiro dia de contacto das células com cada um dos materiais

Observando o gráfico da Figura 3.20 verificamos que a percentagem de população relativamente ao controlo em todos os materiais é superior a $\approx 80\%$ chegando até aos 96% , o que revela uma boa adesão por parte das células. Por outro lado, observamos também que a população de células é aparentemente menor para as espumas que têm na sua constituição HAp, atingindo um valor mais baixo para as amostras que continham maior quantidade de HAp (P7H10). Isto poderá estar associado ao facto da HAp se apresentar um pouco ácida devido aos procedimentos a que foi sujeita para se tornar nanométrica e que envolvem o uso de ácidos. Este facto pôde ser comprovado durante a cultura celular realizada, em que se observou uma ligeira mudança de cor do meio (ligeiramente amarelado) nos poços com HAp, indicativo de um meio ácido. No entanto, é necessário ter em conta a incerteza associada³ que faz com que a diferença de adesão verificada entre os diferentes materiais não seja estatisticamente significativa.

Para se afirmar se um material é ou não viável para aplicação em meio biológico é necessário avaliar também a evolução temporal da população celular. O cálculo da percentagem de população segue o mesmo raciocínio descrito antes, em que os valores populacionais médios do 1º e 2º dias ($j=1,2$) são sempre relativos ao valor médio das populações registadas no 1º dia.

³ Incerteza calculada pelo método da propagação das incertezas

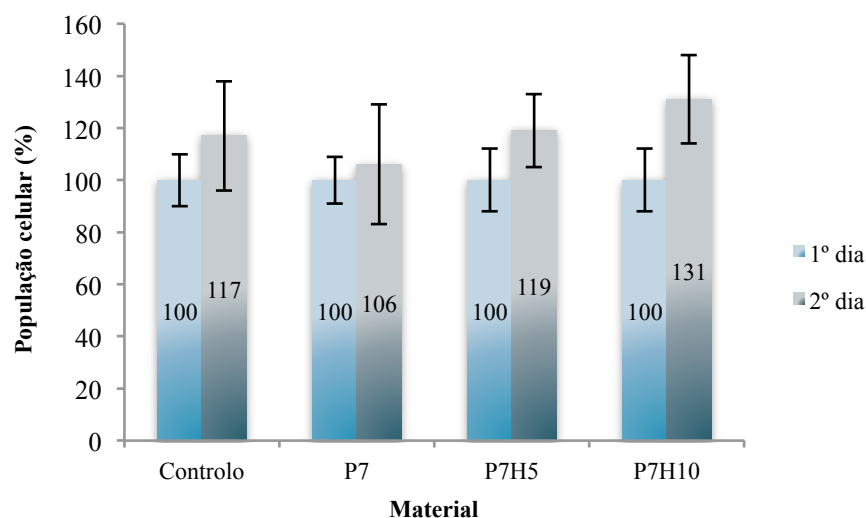


Figura 3.21 – Evolução temporal da população celular nos 1º e 2 dias, após contacto das células com cada um dos materiais

A Figura 3.21 mostra um aumento da população do 1º para o 2º dia nos três tipos de material, o que sugere que as células se multiplicaram. Observa-se que o crescimento celular detectado nos três tipos de material e nos respectivos controlos, é sensivelmente idêntico. As populações correspondentes aos materiais com HAp aumentaram, pelo que se conclui que a acidez detectada nos poços com HAp não influenciou negativamente a proliferação celular. Isto pode ser atribuído às várias lavagens realizadas com PBS e o próprio meio de cultura que acabaram por neutralizar o material.

Na Figura 3.22 encontram-se as imagens de SEM de osteoblastos saudáveis aderidos à superfície das espumas, comprovando a sua adesão.

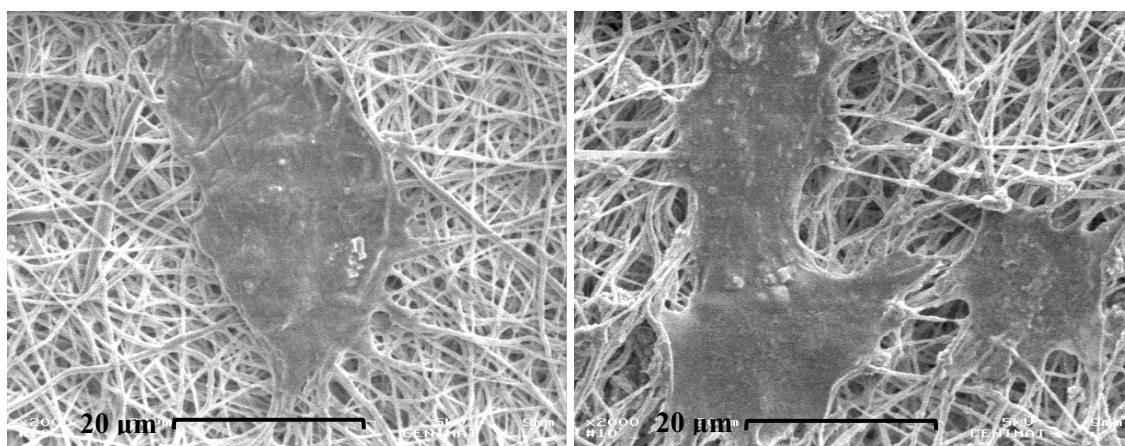


Figura 3.22 – Imagens de SEM de células aderidas à superfície de espumas a (A) P7 e (B) P7H10, com ampliação x2000

Em suma, podemos concluir que as espumas produzidas são promissoras para aplicação em engenharia de tecidos, favorecendo a proliferação celular. No entanto, será necessário realizar mais ensaios e durante mais tempo para podermos afirmar com toda a certeza que as espumas apresentam viabilidade celular.

4. Conclusões e Perspectivas futuras

Com a realização desta dissertação foi possível produzir dois tipos de *scaffolds* – membranas e espumas –, partindo do mesmo princípio básico e que têm futuro para a aplicação em Engenharia de Tecidos.

Os objectivos estipulados inicialmente foram cumpridos, tendo-se concluído que o mecanismo de auto-organização de fibras em forma de favos pelo processo de electrofiação, depende de um conjunto de factores que se contrabalançam entre si.

Crê-se que este mecanismo seja guiado pela interacção de forças atractivas e repulsivas de fibras em estado húmido no colector. Zonas onde haja maior densidade de fibras constituem um maior foco para atrair mais fibras em voo e por outro lado, repelir as fibras que se encontram já depositadas no colector. A presença das fibras em estado húmido é conseguido mais facilmente mediante a utilização de soluções de baixa concentração ou de um solvente com uma temperatura de ebulição elevada.

Com o tempo de deposição, a espessura da membrana aumenta e vão-se construindo favos, uns sobre os outros, prevalecendo os favos de maiores dimensões. Este processo pode ser acelerado com o uso de um colector com depressões isolantes e fundo condutor, pois as fibras electricamente carregadas tendem a dirigir-se para regiões onde são mais atraídas e onde possam dissipar mais facilmente as cargas que transportam – fundo condutor. Por isso, as depressões vão sendo eficientemente preenchidas, construindo uma espuma estratificada com alguns milímetros de espessura, em que cada substrato é constituído por uma série de favos.

A maioria dos parâmetros de electrofiação influencia, directa ou indirectamente, a distribuição de cargas do jacto polimérico e isso conduz à formação de favos de dimensões e geometrias (com arestas mais definidas ou mais arredondados) distintas – a concentração da solução, a tensão aplicada, a distância ao colector, o caudal, a humidade relativa, a natureza do solvente e a condutividade e viscosidade da solução.

Mostrou-se também que a auto-organização de fibras não está limitada apenas a polímeros, mas estende-se também a compósitos. Relatou-se aqui, pela primeira vez, a formação de favos a partir de soluções poliméricas com um biocerâmico incorporado (HAp), revelando ter grande impacto neste mecanismo. Este facto foi atribuído às alterações provocadas na viscosidade e condutividade das soluções, bem como o arrastamento de partes da solução causado pela HAp.

A bioactividade dos *scaffolds* compósitos conferida pela HAp foi comprovada, tendo-se observado a precipitação de cristais apatíticos na superfície das fibras que realçaram os limites

dos favos. Isto mostra que as membranas possuem propriedades mineralizantes, o que é extremamente importante em tecidos mineralizados, como o osso ou a dentina.

As espumas apresentaram elevada porosidade semelhante à do osso trabecular e demonstraram o comportamento característico de uma espuma, com as zonas elástica, o patamar de colapso e a densificação. O módulo de Young sofreu um incremento na presença de HAp bem dispersa. Evidenciaram ainda deformações de compressão bastante elevadas (próximas de 100 %), o que indicia uma grande plasticidade por parte das espumas.

A cultura celular das espumas *in vitro* provou a sua biocompatibilidade, reunindo as condições necessárias para possível aplicação no tecido ósseo.

Futuramente, o processo de produção das espumas deverá ser otimizado por forma a obter espumas com maior espessura e módulo de Young, o que poderá ser conseguido mudando as dimensões do colector. Além disso, uma das dificuldades encontradas na produção das espumas foi o preenchimento das depressões que exigia um grande período de tempo. Tal foi causado pelo desperdício de solução quando fibras se depositavam na parte posterior do colector, que era condutora, e também pela presença de muitas depressões (muitos locais possíveis de deposição de fibras). A aplicação de uma tensão negativa no colector – conseguido pelo uso de uma fonte de alta tensão no colector – poderá também obviar este efeito.

Mais testes mecânicos e com maior dimensão amostral também devem ser feitos para que se possa definir um padrão relativamente aos valores de módulo de Young das espumas. O mesmo será aplicável às membranas. Outras concentrações, tanto de PCL como de HAp, poderão ser testadas, por forma a maximizar as propriedades mecânicas e morfológicas das membranas e espumas, não desprezando o efeito de aglomeração da HAp.

Posteriormente, mais testes celulares terão de ser feitos, com culturas celulares realizadas durante um período de tempo maior para comprovar efectivamente a sua viabilidade. Será interessante também estudar o percurso das células nas espumas utilizando, por exemplo, marcadores fluorescentes, avaliando se as células são capazes de penetrar pela estrutura.

A comunidade científica está recentemente a ganhar interesse na origem da auto-organização de fibras e nas potencialidades que representam em Engenharia de Tecidos. A realização de mais testes e com maior fiabilidade poderão conferir grandes avanços na medicina regenerativa, principalmente no osso e na dentina.

Bibliografia

- [1] R. Langer and J. P. Vacanti, "TISSUE ENGINEERING," *Science*, vol. 260, pp. 920-926, May 1993.
- [2] M. Nakashima and A. Akamine, "The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics," *Journal of Endodontics*, vol. 31, pp. 711-718, Oct 2005.
- [3] E. Battistella, S. Mele, and L. Rimondini, "Dental Tissue Engineering: a New Approach to Dental," in *Tissue Reconstruction, Biomimetics Learning from Nature*, A. Mukherjee, Ed., ed: Intech, 2010.
- [4] A. J. Salgado, O. P. Coutinho, and R. L. Reis, "Bone tissue engineering: State of the art and future trends," *Macromolecular Bioscience*, vol. 4, pp. 743-765, Aug 2004.
- [5] D. W. Hutmacher, J. T. Schantz, C. X. F. Lam, K. C. Tan, and T. C. Lim, "State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective," *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 1, pp. 245-260, Jul-Aug 2007.
- [6] K. M. Galler, "Scaffolds for dental pulp tissue engineering.," vol. 23, R. N. D'Souza, Ed., ed. Alemanha: Advances in dental research, 2011, pp. 333-339.
- [7] S. Chandra, S. Chandra, M. Chandra, and N. Chandra, *Textbook of Dental and Oral Histology and Embryology with MCQs*, 1ª ed. Nova Deli: Jaypes Brtothers Medical, 2004.
- [8] P. E. Murray, F. Garcia-Godoy, and K. M. Hargreaves, "Regenerative endodontics: A review of current and a call for action," *Journal of Endodontics*, vol. 33, pp. 377-390, Apr 2007.
- [9] J. Moshonov, A. Stabholz, Y. Leopold, and I. Rosenberg, "Lasers in dentistry. Part B-- Interaction with biological tissues and the effect on the soft tissues of the oral cavity, the hard tissues of the tooth and the dental pulp," *Refuʾat ha-peh yeha-shinayim (1993)*, vol. 18, pp. 21-8, 107-8, 2001-Oct 2001.
- [10] D. W. Hutmacher, "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage," *Biomaterials*, vol. 21, pp. 2529-2543, Dec 2000.
- [11] (4 de Fevereiro de 2013). *Histology of bone*, Disponível em <<http://emedicine.medscape.com/article/1254517-overview>>.

- [12] J. Vasconcelos, "Produção de matrizes porosas 3D baseadas em réplicas invertidas de cristais coloidais," Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica, Universidade Nova de Lisboa da Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2013.
- [13] H. N. Park, J. B. Lee, H.-J. Moon, D. H. Yang, and K. Kwon, "The Potential of Biomimetic Electrospun-Nanofibrous Scaffolds for Bone Tissue Engineering," in *Nanofibers - Production, Properties and Functional Applications*, D. T. Lin, Ed., ed: Intech, 2011, pp. 327-346.
- [14] R. Vasita and D. S. Katti, "Nanofibers and their applications in tissue engineering," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 1, pp. 15-30, 2006.
- [15] B. S. Mitchell, "An Introduction to Materials Engineering and Science for chemical and materials engineers," ed Hoboken, Nova Jersey: John Wiley, 2004, pp. 76-98, 99-113, 114-127, 515-533.
- [16] V. Karageorgiou and D. Kaplan, "Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 5474-5491, Sep 2005.
- [17] L. C. Junqueira and J. Carneiro, "Histologia Básica," 10ª ed Brasil: Guanabara Koogan, 2004, pp. 136-153.
- [18] F. Judas, "Estrutura e Dinâmica do Tecido Ósseo," P. Palma, Ed., ed, 2012.
- [19] (3 de Março de 2013). *Tecido Ósseo*, Disponível em <<http://www.infoescola.com/histologia/tecido-osseo/>>.
- [20] S. Pramanik, B. Pingguan-Murphy, and N. A. Abu Osman, "Progress of key strategies in development of electrospun scaffolds: bone tissue," *Science and Technology of Advanced Materials*, vol. 13, Aug 2012.
- [21] A. R. Ten Cate, *Oral Histology: Development, Structure, and Function*, 5ª ed. St. Louis: Mosby Inc, 1998.
- [22] S. Sharma, V. Sikri, N. Sharma, and M. Sharma, "Regeneration of tooth pulp and dentin: trends and advances," *Annals Comp Review*, vol. 17, pp. 31-43, 2010.
- [23] (15 de Setembro de 2013). *Histologia II*, Disponível em <<http://metodologiacientificafouff.blogspot.pt/2010/05/histologia.html>>.
- [24] (18 de Junho de 2013). *Human Tooth*, Disponível em <<https://encrypted-tbn1.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcR66Zcv0QpV1qq77vAxFJQS1G2kOiuJEvrvFL6lqeAq2WyBastz>>.
- [25] (15 de Setembro de 2013). *Dentin regrowth*, Disponível em <<http://www.longevity.org/forum/topic/65397-dentin-regrowth/>>.
- [26] Q. P. Pham, U. Sharma, and A. G. Mikos, "Electrospun Poly(ϵ -caprolactone) Microfiber and Multilayer Nanofiber/Microfiber Scaffolds: Characterization of Scaffolds and Measurement of Cellular Infiltration," *Biomacromolecules*, vol. 7, pp. 2796-2805, 2006.

- [27] R. Barbucci, *Biomaterials Science Integrated*, 1ª ed. Nova Iorque, Boston, Dordrecht, Londres, Moscovo: Kluwer Academic, 2002.
- [28] N. G. Sahoo, Y. Z. Pan, L. Li, and C. B. He, "Nanocomposites for bone tissue regeneration," *Nanomedicine*, vol. 8, pp. 639-653, Apr 2013.
- [29] M. Labet and W. Thielemans, "Synthesis of polycaprolactone: a review," *Chemical Society Reviews*, vol. 38, pp. 3484-3504, 2009.
- [30] J. Martins, "Membranas Compósitas de Policaprolactona/Hidroxiapatite para Aplicação Estomatológica," Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica, Universidade Nova de Lisboa da Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2011.
- [31] (18 de Fevereiro de 2013). *Polycaprolactone*, Disponível em <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/440752?lang=pt®ion=PT>>
- [32] B. Ratner, A. Hoffman, F. Schoen, and J. Lemons, *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, 2ª ed. Amsterdão, Boston, Heidelberg, Londres, Nova Iorque, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapura, Sydney e Tóquio: Elsevier, 2004.
- [33] J. Kohn, S. Abramson, and R. Langer, "Bioresorbable and Bioerodible Materials," in *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, B. D. Ratner, A. S. Hoffman, and F. J. Schoen, Eds., 2ª ed Amesterdão, Boston, Heidelberg, Londres, Nova Iorque, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapura, Sydney, Tóquio: Elsevier, 2004, pp. 115-126.
- [34] Y. Z. Wang, G. X. Wang, L. Chen, H. Li, T. Y. Yin, B. C. Wang, *et al.*, "Electrospun nanofiber meshes with tailored architectures and patterns as potential tissue-engineering scaffolds," *Biofabrication*, vol. 1, Mar 2009.
- [35] A. G. Mitsak, J. M. Kemppainen, M. T. Harris, and S. J. Hollister, "Effect of Polycaprolactone Scaffold Permeability on Bone Regeneration In Vivo," *Tissue Engineering Part A*, vol. 17, pp. 1831-1839, Jul 2011.
- [36] B. Ferreira, "Formação e transformação in vitro da hidroxiapatite e seus precursores. Influência da composição inicial do meio e da temperatura," Dissertação de Mestrado em Engenharia de Materiais, Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro e de Química, Universidade de Aveiro, 2002.
- [37] K. P. Sanosh, M. C. Chu, A. Balakrishnan, T. N. Kim, and S. J. Cho, "Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite powder using sol-gel technique," *Bulletin of Materials Science*, vol. 32, pp. 465-470, Oct 2009.
- [38] J. M. Deitzel, J. D. Kleinmeyer, J. K. Hirvonen, and N. C. B. Tan, "Controlled deposition of electrospun poly(ethylene oxide) fibers," *Polymer*, vol. 42, pp. 8163-8170, Sep 2001.

- [39] S. Thandavamoorthy, N. Gopinath, and S. S. Ramkumar, "Self-assembled honeycomb polyurethane nanofibers," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 101, pp. 3121-3124, Sep 2006.
- [40] N. Lavielle, A. Hebraud, C. Mendoza-Palomares, A. Ferrand, N. Benkirane-Jessel, and G. Schlatter, "Structuring and Molding of Electrospun Nanofibers: Effect of Electrical and Topographical Local Properties of Micro-Patterned Collectors," *Macromolecular Materials and Engineering*, vol. 297, pp. 958-968, Oct 2012.
- [41] G. D. Yan, J. Yu, Y. J. Qiu, X. H. Yi, J. Lu, X. S. Zhou, *et al.*, "Self-Assembly of Electrospun Polymer Nanofibers: A General Phenomenon Generating Honeycomb-Patterned Nanofibrous Structures," *Langmuir*, vol. 27, pp. 4285-4289, Apr 2011.
- [42] D. Ahirwal, A. Hebraud, R. Kadar, M. Wilhelm, and G. Schlatter, "From self-assembly of electrospun nanofibers to 3D cm thick hierarchical foams," *Soft Matter*, vol. 9, pp. 3164-3172, 2013.
- [43] T. C. Reis, I. J. Correia, and A. Aguiar-Ricardo, "Electrodynamic tailoring of self-assembled three-dimensional electrospun constructs," *Nanoscale*, vol. 5, pp. 7528-7536, 2013.
- [44] H. F. Chen, B. H. Clarkson, K. Sun, and J. F. Mansfield, "Self-assembly of synthetic hydroxyapatite nanorods into an enamel prism-like structure," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 288, pp. 97-103, Aug 1 2005.
- [45] H. Nalwa, *Handbook of Low and High Dielectric Constants Materials and Their Applications* vol. 1 e 2: Academic Press, 1999.
- [46] Y. Orlova, N. Magome, L. Liu, Y. Chen, and K. Agladze, "Electrospun nanofibers as a tool for architecture control in engineered cardiac tissue," *Biomaterials*, vol. 32, pp. 5615-5624, Aug 2011.
- [47] T. Ruotsalainen, J. Turku, and P. Heikkilä, "Towards Internal Structuring of Electrospun Fibers by Hierarchical Self-Assembly of Polymeric Comb-Shaped Supramolecules," *Advanced Materials*, vol. 17, pp. 1048-1052, 2005.
- [48] P. Franco, "Produção de Fibras de Hidroxiapatite por Electrofiação," Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, Departamento de Ciência dos Materiais, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2009.
- [49] M. J. Lopes, "Projecto de Implementação de um Sistema para Electrofiação Controlado por um Computador.," Dissertação de Mestrado em Engenharia Electrotécnica e de Computadores, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2012.
- [50] V. A. Tavares, "Matrizes de Policaprolactona e Quitosano para aplicação em Engenharia de Tecidos," Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2011.

- [51] P. Franco, J. Silva, and P. Borges, "Produção de fibras de hidroxiapatite por electrofiação," *C.Tecn. Mat.*, vol. 22, pp. 57-64, 2010.
- [52] A. Baji, Y. W. Mai, S. C. Wong, M. Abtahi, and P. Chen, "Electrospinning of polymer nanofibers: Effects on oriented morphology, structures and tensile properties," *Composites Science and Technology*, vol. 70, pp. 703-718, May 2010.
- [53] N. E. Zander, "Hierarchically Structured Electrospun Fibers," *Polymers*, vol. 5, pp. 19-44, Mar 2013.
- [54] V. Pillay, C. Dott, Y. E. Choonara, C. Tyagi, L. Tomar, P. Kumar, *et al.*, "A Review of the Effect of Processing Variables on the Fabrication of Electrospun Nanofibers for Drug Delivery Applications," *Journal of Nanomaterials*, 2013 2013.
- [55] R. M. Nezarati, M. B. Eifert, and E. Cosgriff-Hernandez, "Effects of Humidity and Solution Viscosity on Electrospun Fiber Morphology," *Tissue Engineering Part C-Methods*, vol. 19, pp. 810-819, Oct 2013.
- [56] C. J. Luo, E. Stride, and M. Edirisinghe, "Mapping the Influence of Solubility and Dielectric Constant on Electrospinning Polycaprolactone Solutions," *Macromolecules*, vol. 45, pp. 4669-4680, Jun 2012.
- [57] H. A. Barnes, J. F. Hutton, and K. Walters, *An Introduction to Rheology* Elsevier, 1989.
- [58] (12 de Setembro de 2013). *Viscosimetria*, Disponível em <http://lem.iq.usp.br/ykawano/cursos/QFL5602/Viscosimetria.pdf>.
- [59] P. D. S. Pilling. (12 de Setembro de 2013). *Viscosidade de líquidos*, Disponível em http://www1.univap.br/spilling/FQE1/FQE1_EXP4_ViscosidadeLiquidos.pdf.
- [60] N. Monteiro, "<div data-canvas-width=\"45.642334693580864\" data-font-name=\"Times New Roman\" dir=\"ltr\" style=\"font-size: 21.0333px; font-family: sans-serif; left: 524.667px; top: 371.3px; transform: scale(0.992225, 1); transform-origin: 0% 0% 0px;\">Caracterização de matrizes de Quitosano para a regeneração de tecidos produzidas pela técnica de TIPS," Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica, Departamento de Física, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2008.
- [61] (12 de Setembro de 2013). *Reologia de fluidos*, Disponível em <http://enq.ufsc.br/disci/eqa5415/REOLOGIA%20DE%20FLUIDOS%20-%20apostila.pdf>.
- [62] (10 de Setembro de 2013). *Energia da Química*, Disponível em <http://quimicanastaipas.wordpress.com/energia-da-quimica/>.
- [63] (12 de Setembro de 2013). *Rotational rheometers*, Disponível em http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f2/Rotational_rheometers-Couette-Searle-Plate_plate-Cone_plate_types.png.
- [64] P. Griffiths and J. Haseth, *Fourier Transform Infrared Spectrometry* 2ª ed. Estados Unidos da América (New Jersey) e Canadá: John Wiley, 2007.

- [65] J. Schmitt and H. C. Flemming, "FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis," *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 41, pp. 1-11, 1998.
- [66] A. J. Monteiro, "Revestimentos multicamada PVD com comportamento electrónico," Dissertação de Mestrado, Universidade do Minho, 2005.
- [67] H. M. Kim, T. Himeno, T. Kokubo, and T. Nakamura, "Process and kinetics of bonelike apatite formation on sintered hydroxyapatite in a simulated body fluid," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 4366-4373, Jul 2005.
- [68] X. Lu and Y. Leng, "Theoretical analysis of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 1097-1108, Apr 2005.
- [69] A. Oliveira, J. Oliveira, R. Oréfice, H. Mansur, and M. Pereira, "Avaliação das propriedades mecânicas de espumas híbridas de vidro bioativo/álcool polivinílico para aplicação em engenharia de tecidos," *Matéria*, vol. 12, pp. 140-149, 2007.
- [70] L. J. Gibson and M. F. Ashby, *Cellular solids: Structure and properties*, 2^a ed. Cambridge, Nova Iorque, Melbourne: Cambridge University, 1997.
- [71] L. J. Gibson, "Biomechanics of cellular solids," *Journal of Biomechanics*, vol. 38, pp. 377-399, Mar 2005.
- [72] J. Davis, *Animal Cell Culture: Essential Methods*: John Wiley & Sons, 2011.
- [73] H. J. Keh and J. M. Ding, "Electrophoretic mobility and electric conductivity of suspensions of charge-regulating colloidal spheres," *Langmuir*, vol. 18, pp. 4572-4583, Jun 11 2002.
- [74] J. P. Gittings, C. R. Bowen, A. C. E. Dent, I. G. Turner, F. R. Baxter, and J. B. Chaudhuri, "Electrical characterization of hydroxyapatite-based bioceramics," *Acta Biomaterialia*, vol. 5, pp. 743-754, Feb 2009.
- [75] M. H. Santos, L. G. D. Heneine, and H. S. Mansur, "Synthesis and characterization of calcium phosphate/collagen biocomposites doped with Zn²⁺," *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*, vol. 28, pp. 563-571, May 1 2008.
- [76] T. Elzein, M. Nasser-Eddine, C. Delaite, S. Bistac, and P. Dumas, "FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 273, pp. 381-387, May 15 2004.
- [77] S. Koutsopoulos, "Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 62, pp. 600-612, Dec 15 2002.
- [78] A. K. Bassi, J. E. Gough, M. Zakikhani, and S. Downes, "The Chemical and Physical Properties of Poly(ϵ -caprolactone) Scaffolds Functionalised with Poly(vinyl phosphonic acid-co-acrylic acid)," *Tissue Engineering*, vol. 2011, pp. 1-9, 2011.

- [79] P. M. M. Lira. (2 de Setembro de 2013). *Materiais Dielétricos*, Disponível em <http://www.ufpi.edu.br/subsiteFiles/zurita/arquivos/files/Materiais%20parte%203.pdf> ≥.
- [80] (28 de Julho de 2013). *Propriedades eléctricas do teflon*, Disponível em <http://www.polifluor.com.br/propriedades-eletricas-teflon.html>.

Anexos

Anexo A

Produção dos pós de HAp

Reagentes:

- HAp
- Água destilada
- Ácido nítrico
- Hidróxido de amónia

Procedimento:

1. Adicionaram-se 10 g de HAp (Sigma-Aldrich), a 500 mL de água destilada, deixando a solução sob agitação magnética.
2. De seguida, juntou-se ácido nítrico (HNO_3 , Panreac: $\geq 65\%$) com auxílio de uma pipeta de *Pasteur* até a HAp se dissolver por completo, ficando a solução transparente.
3. Posteriormente, mediu-se o pH da solução (ROTH) e ajustou-se para pH=2 com o mesmo ácido, o que corresponde a ter uma solução com razão estequiométrica de $\text{Ca/P}=1,67$, isto é, a HAp pura.
4. De seguida adicionou-se, sob agitação constante, hidróxido de amónia (NH_3 , Panreac: 25 %) gota-a-gota, com o auxílio de uma pipeta de *Pasteur*, até a obtenção de uma solução aquosa super-saturada de pH=9. Este passo serve para promover a nucleação e o crescimento dos bastonetes.
5. Depois, a solução foi colocada numa estufa (Mettler) a 37 °C durante 3 dias. De salientar que a variação do pH, a temperatura e a duração da incubação, são factores determinantes nas dimensões dos bastonetes de HAp.
6. Após os 3 dias na estufa, a solução foi centrifugada por 10 minutos a 10000 rpm numa centrífuga (Heraeus, Multifuge X1R, Thermo Scientific).

7. Depois da centrifugação, o sobrenadante é desprezado e é adicionada água destilada. Este procedimento de centrifugação foi repetido as vezes necessárias para que o pH do sobrenadante fosse de sensivelmente 7.
8. Posteriormente, a solução foi liofilizada (Vaco 2, Zirbus) por 24 horas, com o intuito de retirar toda a água contida na amostra e assim obter a HAp em pó.

Anexo B

Preparação de 1 L de solução SBF

Reagentes e quantidades:

- 6,547 g de NaCl (Panreac)
- 2,268 g de KCl (Panreac)
- 0,0373 g de NaHCO₃ (Merk)
- 0,178 g de MgCl₂.6H₂O (Roth: ≥ 99 %)
- 0,305 g de Na₂SO₄ (Panreac: ≥ 99 %)
- 15 mL de solução de 1 M de HCl (Panreac: 37 %)
- 0,368 g de CaCl₂.2H₂O (Sigma-Aldrich: ≥ 99 %)
- 0,071 g de Na₂HPO₄.2H₂O (em vez de K₂HPO₄.3H₂O, assegura [HCO³⁻]) (Fluka: 98 %)
- 6,057 g de Tris ((CH₂OH)₃CNH₂) (Apollo Scientific Limited)
- Solução de 1 M de HCl “tritrate” até pH=7,4 a 37 °C

Procedimento experimental:

1. Os reagentes foram adicionados um a um, após dissolução completa, em 700 mL de água destilada (desionizada), mediante a ordem apresentada.
2. Após adição do 9º reagente (Tris), aqueceu-se a solução desde a temperatura ambiente até à de 37 °C.
3. Adicionou-se água até perfazer 1 L de solução.
4. A solução foi conservada a 5 °C.

Anexo C

Cultura de células aderentes

Células aderentes, como os osteoblastos, têm origem em tecidos duros, e por isso necessitam de adesão a uma superfície de contacto para que a sua proliferação possa ter início. Assim, as garrafas de cultura utilizadas devem possuir carga negativa, para mediar a produção de proteínas de adesão e de proteoglicanos. Estas proteínas darão início ao processo de adesão célula-garrafa. As células aderem, então, à superfície da garrafa de cultura formando uma monocamada celular.

Quando toda a superfície disponível para adesão é coberta pelas células (confluência) ou os nutrientes se esgotam, as células deixam de proliferar.

O procedimento adoptado encontra-se descrito de seguida:

1. Avaliaram-se as culturas mediante a sua observação ao microscópio invertido. Pretende-se neste passo determinar o grau de confluência das células e investigar se estão desprovidas de qualquer contaminação, quer microbiana, quer fúngica.
2. Aspirou-se o meio de cultura com o auxílio de uma pipeta ou um aspirador, evitando que se tocasse com a respectiva ponta no fundo da garrafa onde se encontrava a camada de células.
3. Adicionou-se cerca de 5 mL de PBS, sem Ca^{2+} nem Mg^{2+} , à garrafa de modo a lavar a camada de células e voltou-se a aspirar, como descrito no passo anterior. Este passo deve ser repetido quando as células estão fortemente aderidas ao substrato.
4. Juntaram-se alguns μL de tripsina previamente aquecida para que as células se soltassem do fundo da garrafa de cultura. Agitou-se ligeiramente o frasco para que a tripsina cubrisse todas as células e de seguida removeu-se o excesso.
5. Confirmou-se, com um microscópio invertido, se as células se soltaram e se se encontravam em suspensão. Caso seja necessário, podem-se dar suaves batidas na garrafa para que as células se desprendam do fundo.
6. Colocou-se a garrafa de cultura na incubadora a 37 °C durante 5 minutos.

7. Estando as células em suspensão, adicionou-se cerca de 2 mL de meio de cultura completo para diluir a tripsina. Deste, retirou-se 50 μ L para realizar a contagem das células e o restante para tubo de centrífuga de 15 mL.
8. Centrifugou-se a suspensão de células a 125 g por 5 minutos. A centrifugação permite que a tripsina se separe das células, que constituem o *pellet*.
9. Depois do conteúdo estar centrifugado, decantou-se o sobrenadante e re-suspendeu-se as células através da adição de 2 mL de meio. Para ajudar neste processo, pode-se, com uma pipeta, aspirar um pouco o meio e voltar a verter ou dar suaves pancadas no tubo.
10. Transferiu-se o volume correspondente a uma densidade de células adequada, para um frasco devidamente rotulado.
11. Semearam-se as células de acordo com a densidade recomenda – entre 20 000 e 40 000 células/cm² – e levou-se o frasco de cultura à incubadora.

Contagem de células

Trabalhos que impliquem o uso de células é necessária a sua avaliação constante. Uma das formas de avaliar o crescimento celular é através de métodos de quantificação. Um crescimento celular devidamente controlado permitirá otimizar os procedimentos de cultura e consequentemente, os seus resultados.

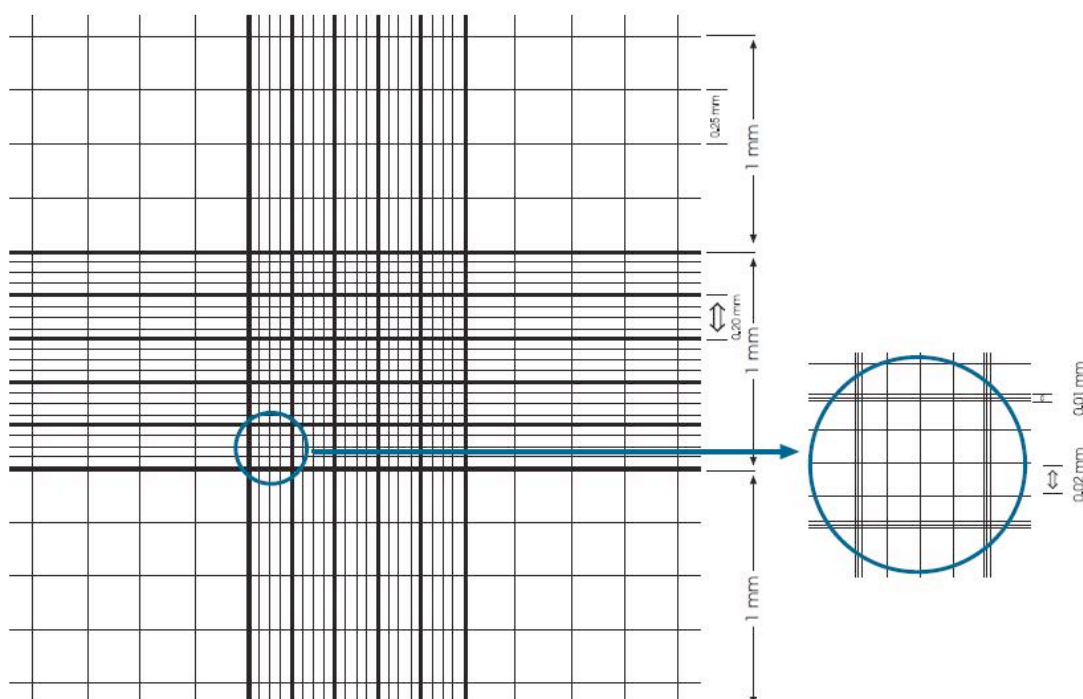
Para realizar a contagem, utilizou-se o azul tripano, um corante que para permitir a distinção entre as células vivas e mortas. Quando uma célula morre, a sua membrana rompe-se e possibilita a entrada do corante para o interior da célula, ganhando uma coloração azul. Ao contrário, uma célula viva possui a sua membrana celular intacta, impedido a entrada do azul tripano.

A contagem de células adoptado neste trabalho segue o seguinte procedimento:

1. Transferiu-se para um microtubo 50 μ L de suspensão de células e igual volume de azul tripano (factor de diluição 2). A adição do azul tripano deve ser realizada com especial cuidado de modo a evitar a formação de bolhas de ar. Caso isso aconteça, deve-se rebentá-las com o auxílio da ponta da pipeta.

2. Limpou-se o hemocitômetro com álcool (Isopropanol a 70 % V/V) e colocou-se uma lamela humidificada sobre este.
3. Colocou-se cerca de 10 μL da suspensão de células com azul tripano nas câmaras do hemocitômetro, com cuidado para que não transbordasse.
4. Visualizaram-se as células no hemocitômetro ao microscópio invertido com contraste de fase (ampliação x20).
5. Contaram-se as células vivas (esferas brilhantes) e as mortas (esferas azuladas). Deve-se contar o número de quadrados em que seja possível contar mais de 100 células, para aumentar o rigor de percentagem de células viáveis.
6. Por fim, determinou-se a concentração de células viáveis.

De seguida ilustra-se o esquema de contagem do hemocitômetro. As câmaras possuem 0,1 mm de espessura



Concentração de células viáveis (células/mL):

$$\frac{\text{Número de células vivas contadas}}{\text{Número de quadrados contados com 1 mm de lado}} \times \text{diluição} \times 10\,000$$

Concentração de células não viáveis (células/mL):

$$\frac{\text{Número de células mortas contadas}}{\text{Número de quadrados contados com 1 mm de lado}} \times \text{diluição} \times 10\,000$$

Porcentagem de células viáveis (células/mL):

$$\frac{\text{Número de células vivas contadas}}{\text{Número de células mortas contadas}} \times 100$$

Nota:

O factor de 10 000 resulta da conversão do volume da câmara de contagem (0,1 mm³) em mL.

